

**Von der gläsernen  
zur  
maßgeschneiderten Zelle?**

**Stand: 26.11.2015**

# Inhalt:

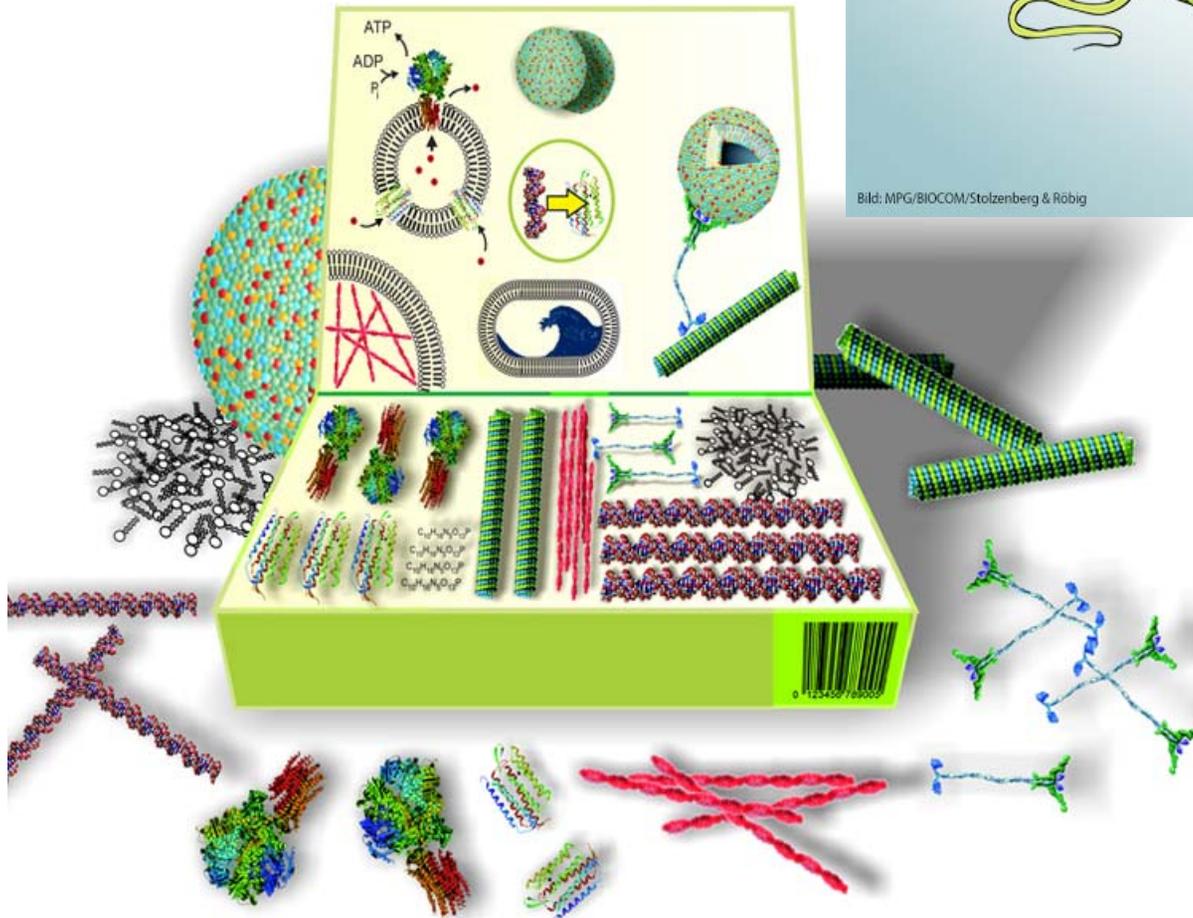
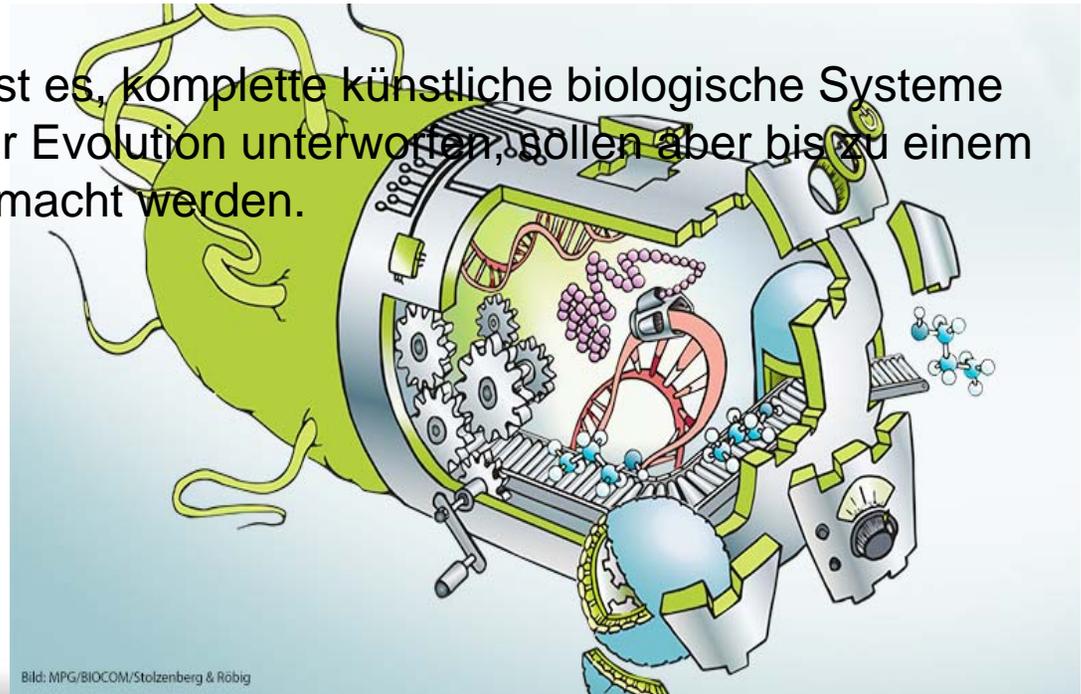
- Quantitatives Verständnis des Metabolismus – Fiktion oder Realität ?
- Empirische Modelle
- $Y_{ATP}$  – Konzept ein einfaches aber ausreichendes Modell ?
- Leistungsgrenzen abgeschätzt aus extremen *Pathways* ?
- MFA – Metabolic Flux Analysis
- MFA und Gentechnik -> Optimierung von Biokatalysatoren
  - 1. Stufe: Optimierung lebender Zellen
  - 2. Stufe: künstliche Minimalzellen

**Quantitatives Verständnis des Metabolismus**

–

**Fiktion oder Realität ?**

Das Ziel der synthetischen Biologie ist es, komplette künstliche biologische Systeme zu erzeugen. Diese Systeme sind der Evolution unterworfen, sollen aber bis zu einem gewissen Grad „mutationsrobust“ gemacht werden.



# DIE NATURWISSENSCHAFTEN

28. Jahrgang

16. August 1940

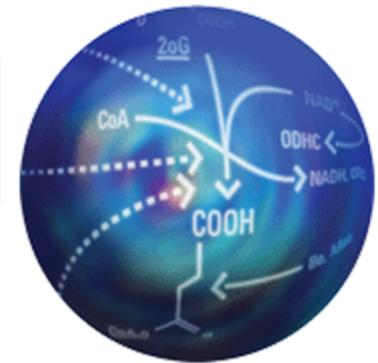
Heft 33

Der Organismus als physikalisches System betrachtet.

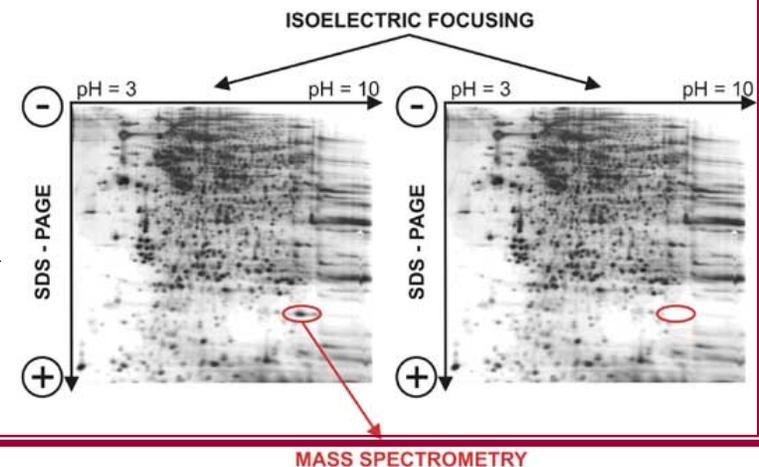
VON LUDWIG VON BERGALANFFY, Wien<sup>1)</sup>.

- ✓ Die Zelle ein offenes, chemisches oder physikalisches System.
  - ✓ Dynamischer stationärer Zustand im Gegensatz zum Gleichgewichtsbegriff
  - ✓ Alle Prozesse die den Zustand bestimmen, sind fein abgestimmt
  - ✓ Die Prozesse sind häufig nichtlinear
- Teleologische Konsequenz:
- ✓ “Eine quantitative Theorie der Lebensvorgänge ist möglich”
  - ✓ “...even after a full explanation of all individual processes are we as far away from a total understanding of metabolism as the sky is wide.” (cited from Hartmann, 1927)

## Was ist heute neu?

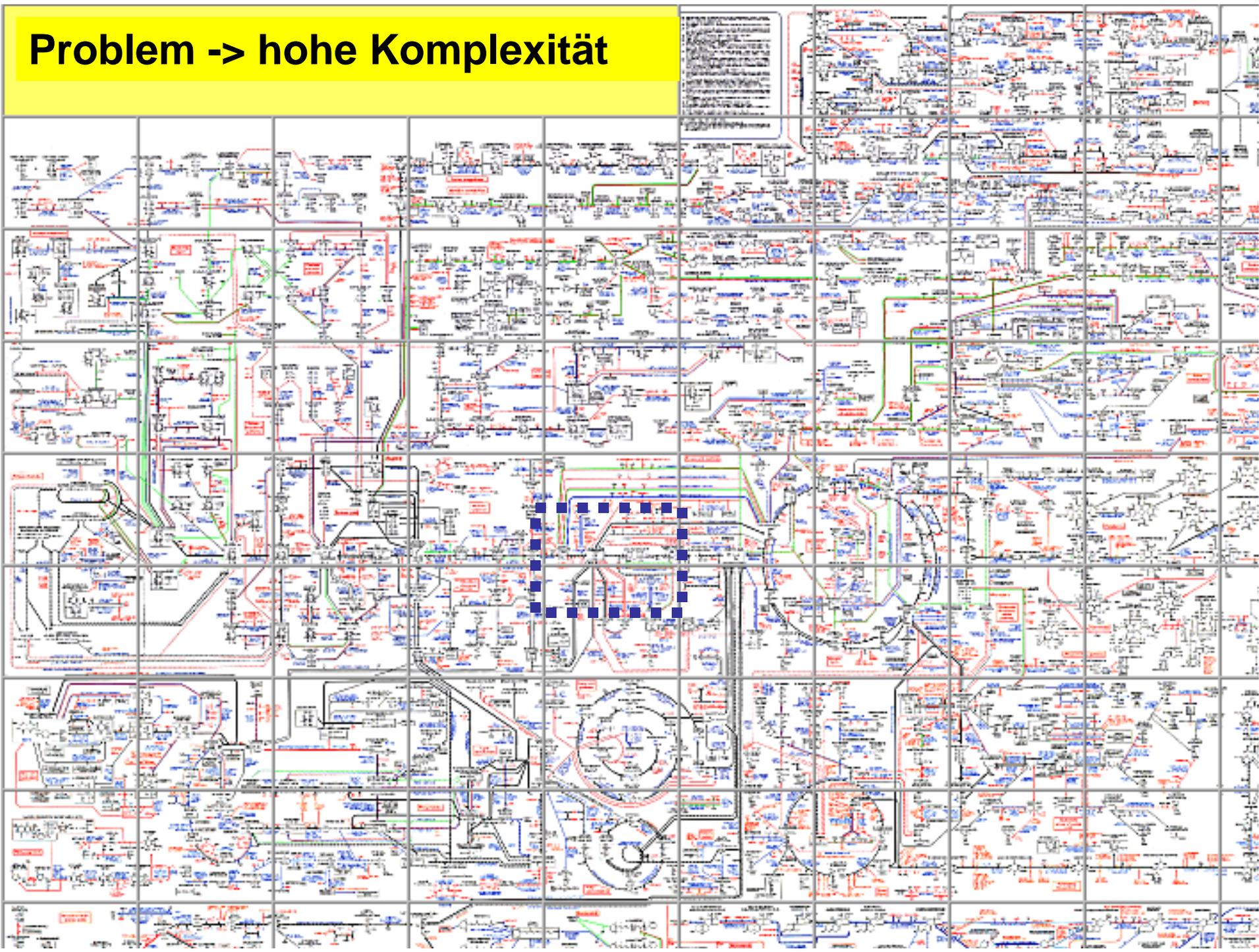


- Extrem hohe Datendichte durch *high-throughput* Methoden (*Microarrays*, Genomics, Transcriptomics, Proteomics, Metabolomics, Cytomics)
- Höhere Datengenauigkeit
- Bessere Theorien, Modelle, numerische Methoden
- Bessere Computer
- “Demokratisierung” von Computern



MASS SPECTROMETRY

**Problem -> hohe Komplexität**



## Problem -> hohe Komplexität alleine?



### ***E. coli***

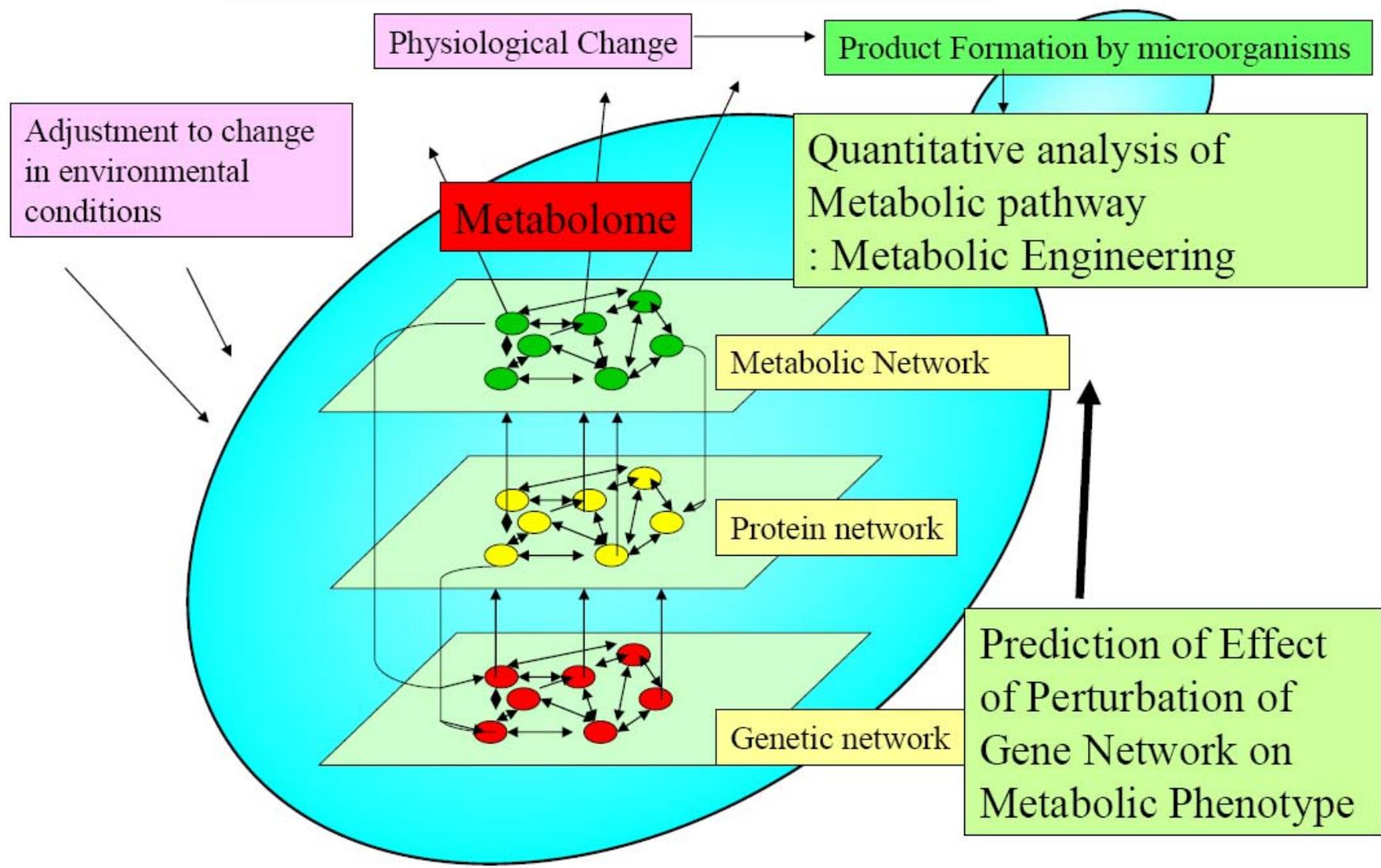
EcoCyc enthält 905 Reaktionen für *E. coli* (161 nicht zum Stoffwechsel kleiner Moleküle, z.B. DNA Replikation; von den verbleibenden 744 wurden 569 mindestens einem Pfad zugeordnet; Dagegen gibt es 607 enzymatische Reaktion; Das Verhalten kann immer noch nicht komplett in-silico beschrieben werden.

### **A380**

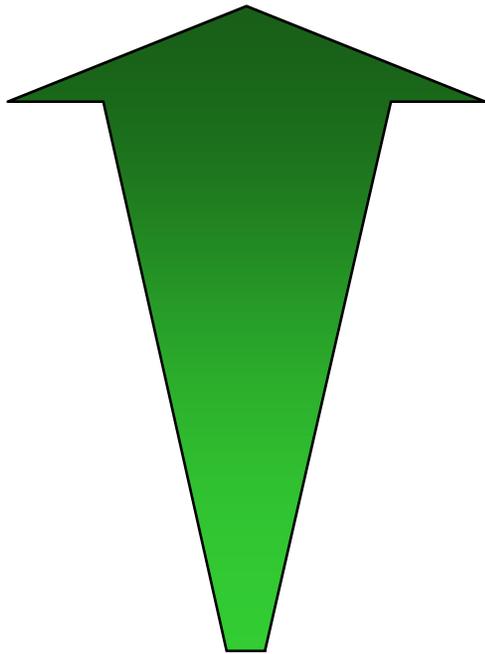
> 6 772 586 Einzelteile komplett in-silico vorherberechnet und funktioniert !!!

# Problem -> hohe Vernetzungsgrad

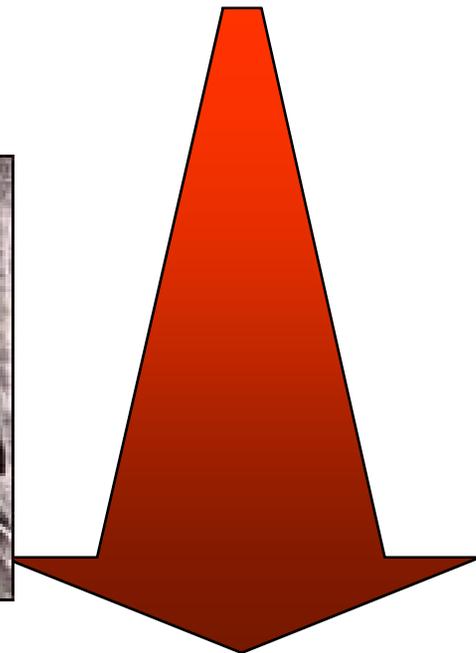
## Hierarchical networks in microorganisms



# Kompromisse bei biologischen Modellen ?



Strukturelle Komplexizität



Durchführbarkeit

# Empirische Modelle

- Typische zelluläre Zusammensetzung  $\text{CH}_{1,8}\text{O}_{0,5}\text{N}_{0,2}$
- Ein Mol biologisches Material wird auf ein C-Atom bezogen:



- Wachstum kann durch eine stöchiometrische Gleichung beschrieben werden:



- $m=2$  und  $n=1$  ( $\text{CH}_2\text{O}_1$ ) – repräsentiert Kohlenhydrate bspw. Glukose  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  in der C1-Schreibweise; (durch Anzahl der C-Atome teilen)

# Empirische Modelle

- Bilanzen können zur Lösung verwendet werden:

$$\text{C: } 1 = Y_{X/S} + Y_{C/S}$$

$$\text{H: } m + 3 Y_{N/S} = 1,8 Y_{X/S} + 2 Y_{H/S}$$

$$\text{O: } n + 2 Y_{O/S} = 0,5 Y_{X/S} + Y_{H/S} + 2 Y_{C/S}$$

$$\text{N: } Y_{N/S} = 0,2 Y_{X/S}$$

- Der respirometrische Quotient ist  $Y_{C/S} / Y_{O/S}$  ( $\text{CO}_2$  – Bildung durch  $\text{O}_2$  – Verbrauch; Abgasanalyse)
- Damit habe ich 5 unabhängige Gleichungen für 5 Unbekannte und kann das Gleichungssystem lösen

# Empirische Modelle

Microorganism	Limiting Nutrient	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	Composition (% by wt)							Empirical Chemical Formula	Formula "Molecular" Weight	
			C	H	N	O	P	S	Ash			
Bacteria			53.0	7.3	12.0	19.0				8	CH <sub>1.666</sub> N <sub>0.20</sub> O <sub>0.27</sub>	20.7
Bacteria			47.1	7.8	13.7	31.3					CH <sub>2</sub> N <sub>0.25</sub> O <sub>0.5</sub>	25.5
<i>Aerobacter aerogenes</i>			48.7	7.3	13.9	21.1				8.9	CH <sub>1.78</sub> N <sub>0.24</sub> O <sub>0.33</sub>	22.5
<i>Klebsiella aerogenes</i>	Glycerol	0.1	50.6	7.3	13.0	29.0					CH <sub>1.74</sub> N <sub>0.22</sub> O <sub>0.43</sub>	23.7
<i>K aerogenes</i>	Glycerol	0.85	50.1	7.3	14.0	28.7					CH <sub>1.73</sub> N <sub>0.24</sub> O <sub>0.43</sub>	24.0
Yeast			47.0	6.5	7.5	31.0				8	CH <sub>1.66</sub> N <sub>0.13</sub> O <sub>0.40</sub>	23.5
Yeast			50.3	7.4	8.8	33.5					CH <sub>1.75</sub> N <sub>0.15</sub> O <sub>0.5</sub>	23.9
Yeast			44.7	6.2	8.5	31.2	1.08	0.6			CH <sub>1.64</sub> N <sub>0.16</sub> O <sub>0.52</sub> P <sub>0.01</sub> S <sub>0.005</sub>	26.9
<i>Candida utilis</i>	Glucose	0.08	50.0	7.6	11.1	31.3					CH <sub>1.82</sub> N <sub>0.19</sub> O <sub>0.47</sub>	24.0
<i>C. utilis</i>	Glucose	0.45	46.9	7.2	10.9	35.0					CH <sub>1.84</sub> N <sub>0.2</sub> O <sub>0.56</sub>	25.6
<i>C. utilis</i>	Ethanol	0.06	50.3	7.7	11.0	30.8					CH <sub>1.82</sub> N <sub>0.19</sub> O <sub>0.46</sub>	23.9
<i>C. utilis</i>	Ethanol	0.43	47.2	7.3	11.0	34.6					CH <sub>1.84</sub> N <sub>0.2</sub> O <sub>0.55</sub>	25.5

**Biomassezusammensetzung häufig ähnlich !!!**

**CH<sub>1,8</sub>O<sub>0,5</sub>N<sub>0,2</sub> 24,6**

# Empirische Modelle

Volumetrische Reaktionsgeschwindigkeit,  $r$  (kg m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>; mol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)

$$r = q X$$

$q$  - spezifische Reaktionsgeschwindigkeit (mol mol<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)

$X$  - Biomassekonzentration (mol L<sup>-1</sup>)

Wachstumsmodell nicht-inhibiert (Monod):

$$q_S = q_S^{Max} \frac{S}{S + K_S} \quad \mu = \mu^{Max} \frac{S}{S + K_S}$$

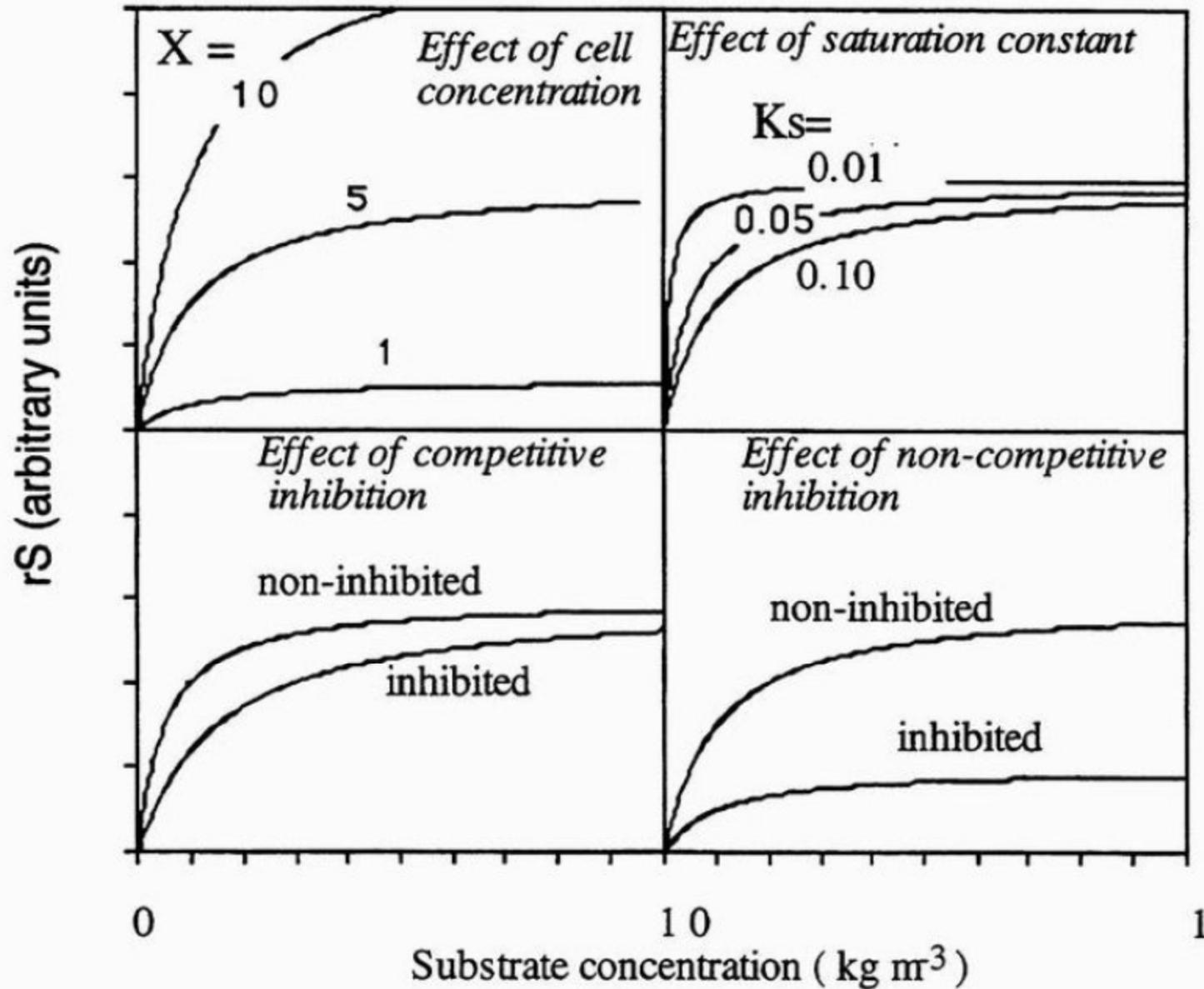
Wachstumsmodell Competitive Inhibierung:

$$q_S = q_S^{Max} \frac{S}{S + K_S (1 + I/K_i)}$$

Wachstumsmodell Nicht-competitive Inhibierung:

$$q_S = \frac{q_S^{Max}}{(1 + I/K_i)} \frac{S}{S + K_S}$$

# Empirische Modelle



# Empirische Modelle

$$r_x = \mu X$$

$$\mu = q_s Y_{x/s}$$

$$\mu = \frac{dX}{dt} \frac{1}{X}$$

where  $Y_{x/s}$  (kg kg<sup>-1</sup>) is the yield coefficient

Substrate	Product	Yield coefficient (kg kg <sup>-1</sup> )
Carbohydrate <sup>1)</sup>	Cells	0.5
Carbohydrate <sup>2)</sup>	Cells	0.7
Carbohydrate <sup>3)</sup>	Cells	0.1
Hydrocarbon	Cells	1
Methanol	Cells	0.5
Oxygen	Cells <sup>4)</sup>	1
Oxygen	Cells <sup>5)</sup>	0.3
Glucose	Ethanol	0.45
Sucrose	Citric acid	0.9
Glucose	Penicillin	0.08

Einfluss N-Quelle

Einfluss Reduktions-  
Grad der C-Quelle

Produktbildung

1) Aerobic metabolism with ammonia as N-source 2) Aerobic metabolism with amino acids as N-source

3) Anaerobic metabolism 4) With carbohydrate as energy source 5) With hydrocarbon as energy source

# Empirische Modelle

Spannweite der Halbsättigungskonstanten  $K_s$

<b>Organism</b>	<b>Substrate</b>	<b><math>K_s</math>(mg/L)</b>
<i>S.cerevisiae</i>	Glucose	50
<i>E.coli</i>	Glucose	5
<i>E.coli</i>	Lactose	20
<i>E.coli</i>	Tryptophan	0.001
<i>E.coli</i>	Phosphate	1.6
<i>Aspergillus</i>	Glucose	5
<i>Candida</i>	Oxygen	0.04
<i>Pseudomonas</i>	Methanol	0.7
<i>Cryptococcus</i>	Thiamine	$10^{-7}$

# Empirische Modelle

Energie für den Erhaltungsstoffwechsel:

$$\frac{1}{Y_{X/S}} = \frac{1}{Y_{X/S}^{Max}} + \frac{q_m}{\mu}$$

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{x/s}} = \frac{\mu}{Y_{X/S}^{Max}} + q_m$$

$$Y_{x/s} = \frac{\mu \cdot Y_{X/S}^{Max}}{\mu + q_m}$$

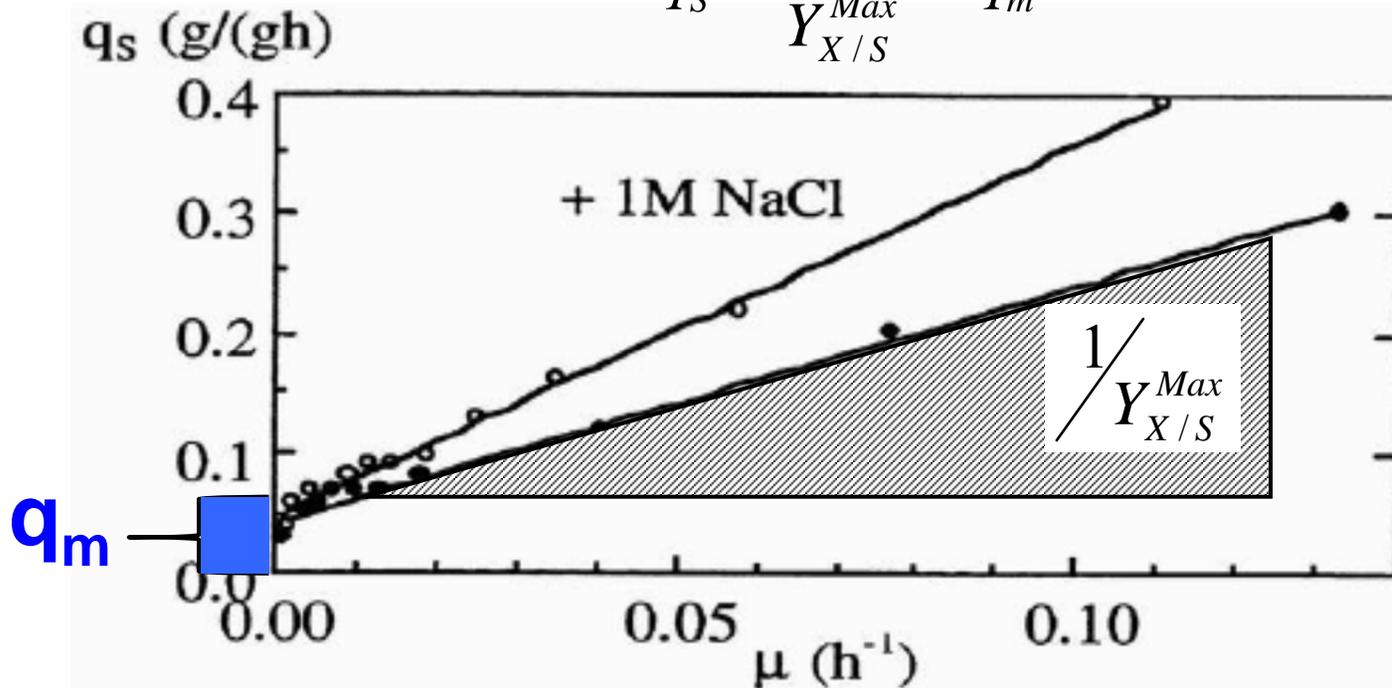
Substrat für Wachstum

Substrat (Energie) für  
Erhaltung

# Empirische Modelle

Energie für den Erhaltungsstoffwechsel:

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{X/S}^{Max}} + q_m$$



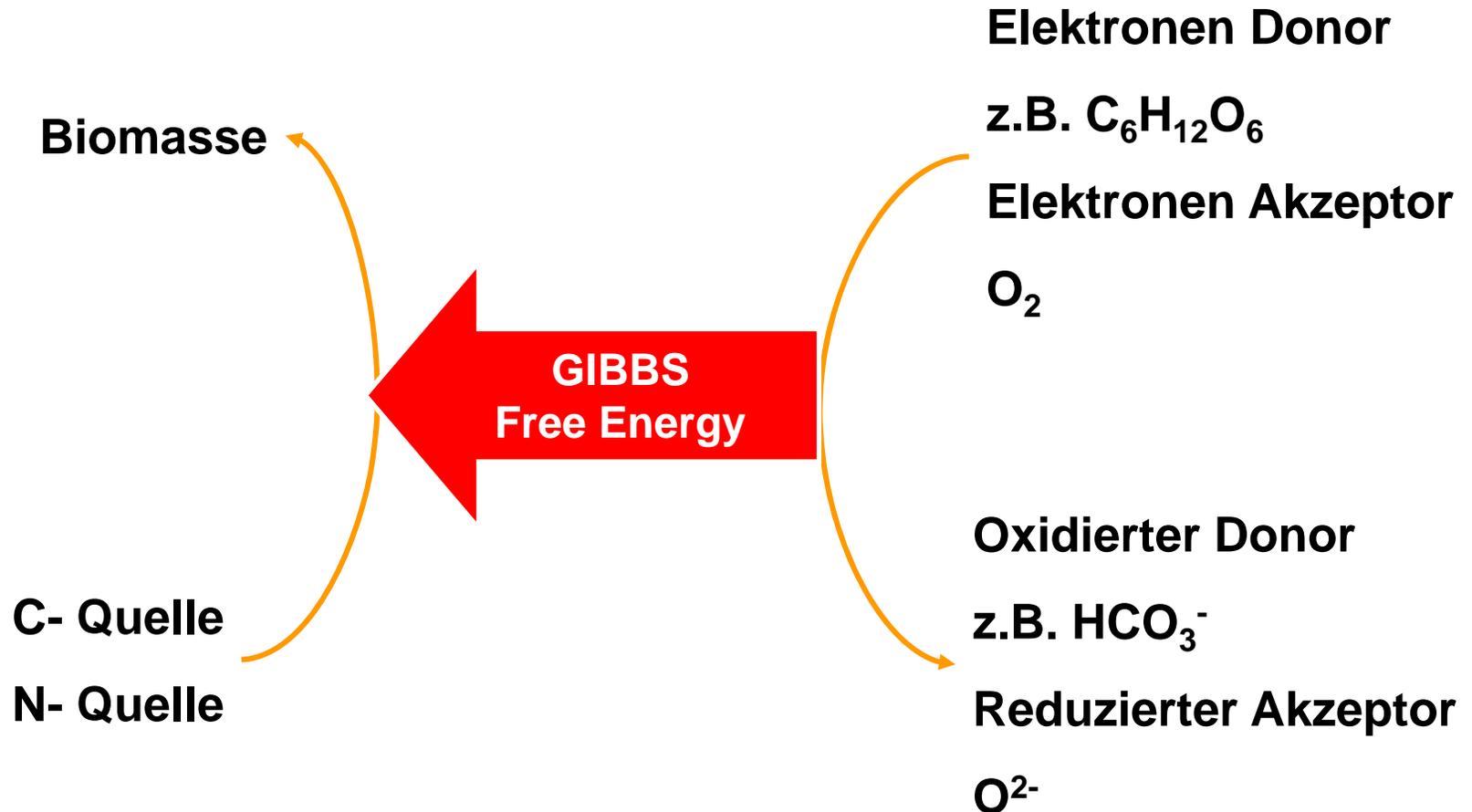
# Empirische Modelle

Energie für den Erhaltungsstoffwechsel:

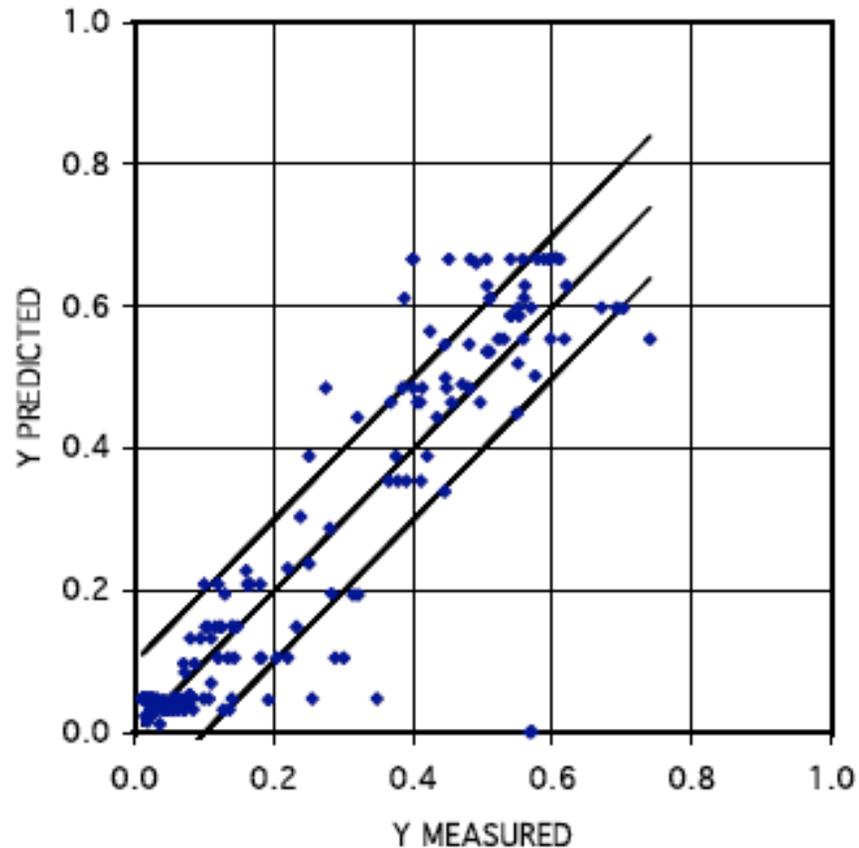
organism	qm (kg kg h <sup>-1</sup> )
<i>Penicillium chrysogenum</i>	0.02
<i>Aspergillus nidulans</i>	0.03
<i>Aerobacter aerogenes</i>	0.09
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (aerobic)	0.01
<i>Sacch. cerevisiae</i> (anaerobic)	0.036
<i>Sacch. cerevisiae</i> (anaerobic) with 1 M NaCl	0.36
<i>Escherichia coli</i>	0.04

# Black Box Modelle

## Anabolismus - Katabolismus



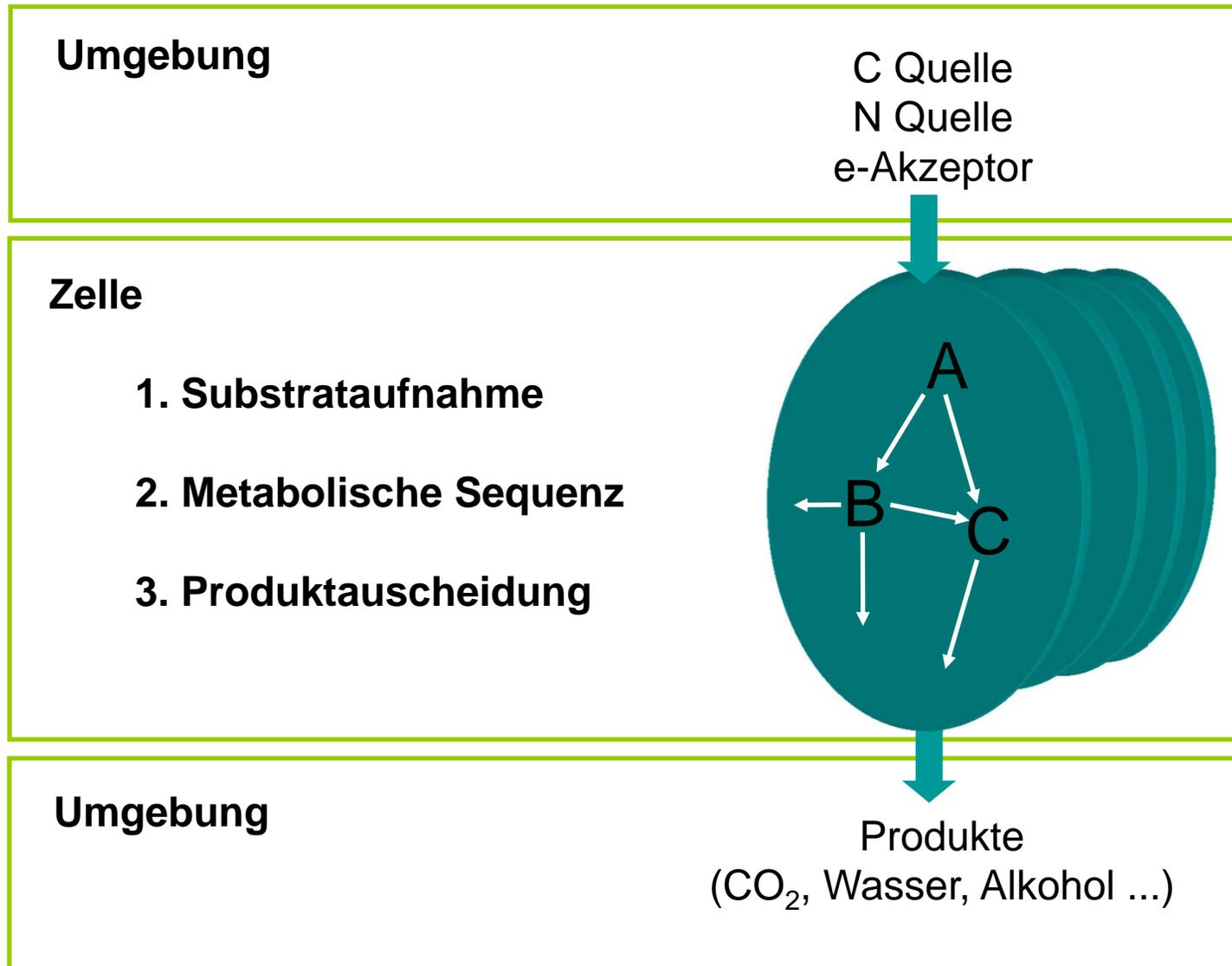
# Black Box Modelle



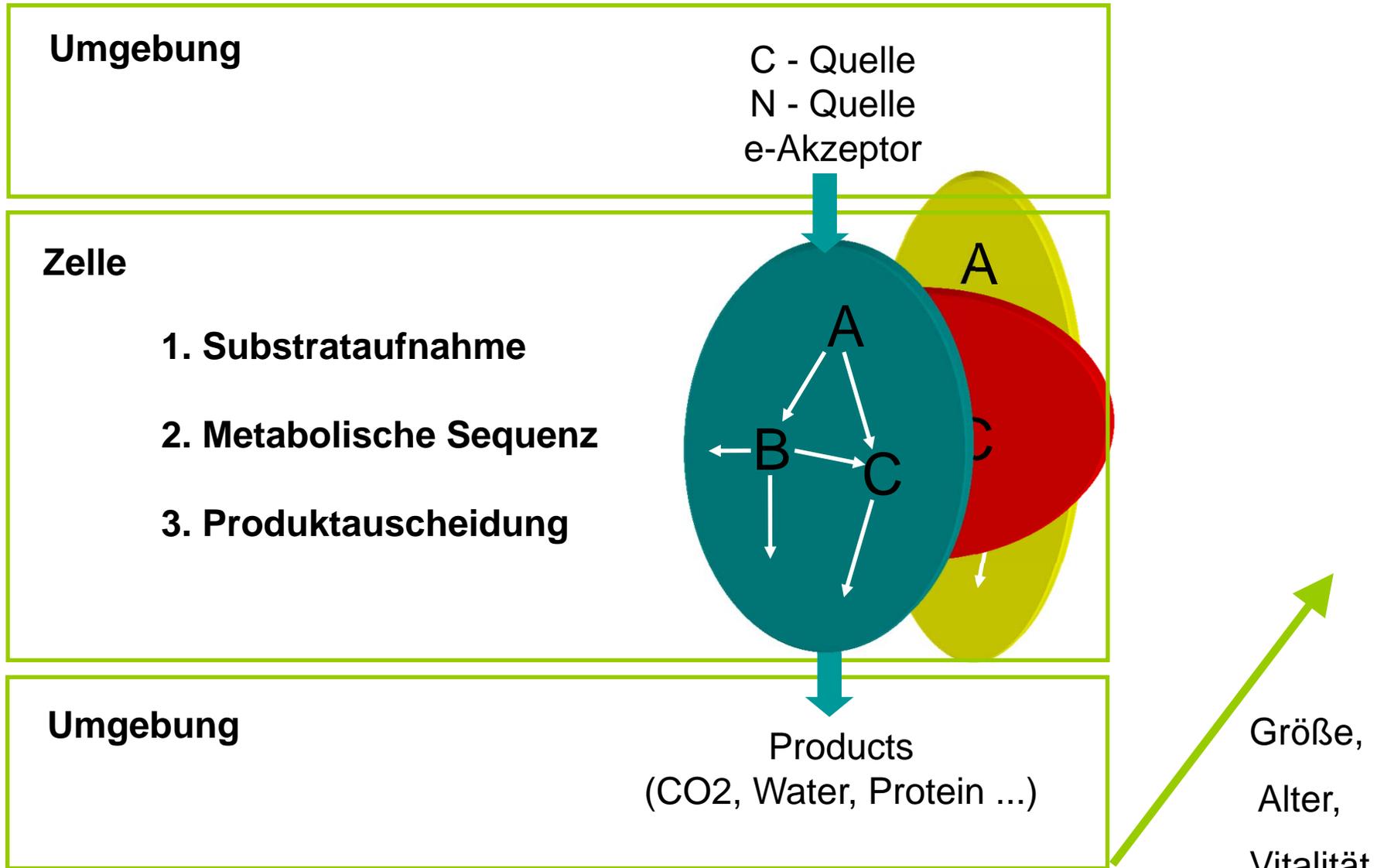
J. J. Heijnen, M. C. M. van Loosdrecht, L. Tijhuis (1992)  
Biotechnol. Bioeng. **40**, 1139-1154 (1992).

**Idee:** Die freie Reaktionsenthalpie hängt ab von der Natur der C-Quelle.

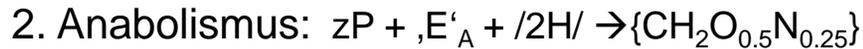
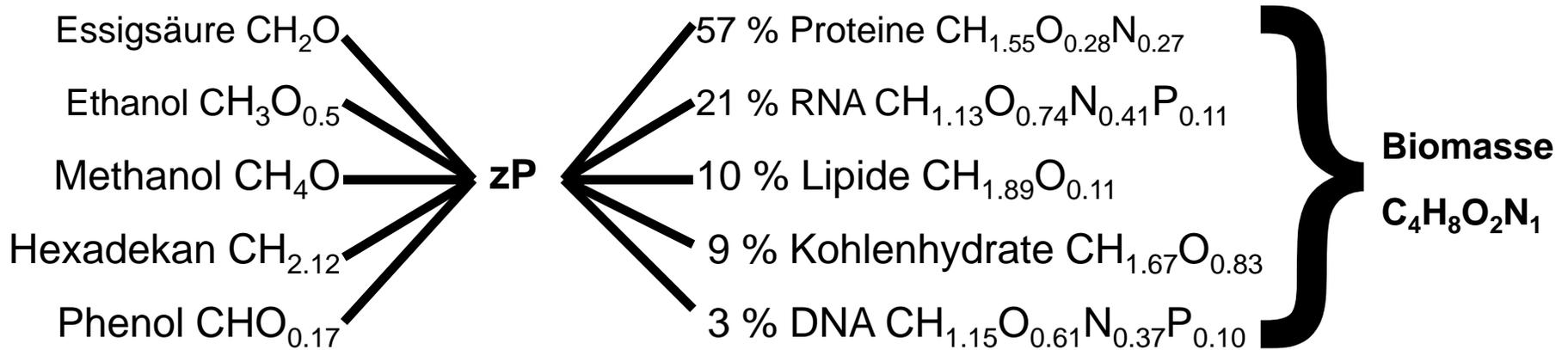
# Strukturierte, nicht-segregierte Modelle



# Strukturierte, segregierte Modelle



# $Y_{ATP}$ – Konzept ein einfaches aber ausreichendes Modell ?



**Zentrale Idee:**  $,E' = ,E'_A + ,E'_D + ,E'_P$ ;  $,E'$  steht für  $ATP_{SLP}$  und  $ATP_{ETP}$



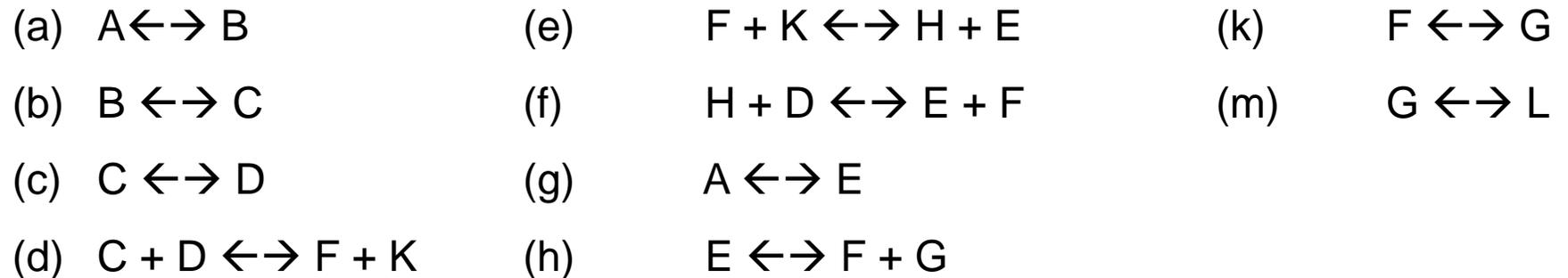
C-Substrat (Assimilationsweg)	Wertigkeit pro C-Mol	Prädiktion $Y_{X/S}$ in g-X/ g-S	Experiment (ohne Berücksichtigung des Assimilationsweges) $Y_{X/S}$ in g-X/g-S	Fehler (min) %
Hexadekan	6,13	1,32 <sup>1)</sup>	0.80 <sup>2)</sup> 0.99 <sup>3)</sup>	+33
Ethanol	6,00	0,83 <sup>1)</sup>	0.68-0.83 <sup>3)</sup> 0.56-0.66 <sup>1)</sup>	0
Phenol (ortho)	4,67	0,77	0.68-0.85 <sup>4),5),6),7)</sup>	0
Phenol (meta)	4,67	0.66	0.68-0.85 <sup>4),5),6),7)</sup>	-3
Benzoessäure (ortho)	4,28	0,57	0.55 <sup>8)</sup>	+4
Glucose (EMD)	4,00	0,53 <sup>1)</sup>	0.45-0.53 <sup>3)</sup>	0
Glucose (ED)	4,00	0,51	0.45-0.53 <sup>3)</sup>	0

1) Babel und Müller 1985, 2) Heinritz et al. 1982, 3) Heijnen und Roels 1981, 4) Reardon et al. 2000, 5) Yang und Humphrey 1975, 6) Hensel und Straube 1990, 7) Müller und Babel 1994, 8) Maskow und Babel 2001a

Produkt	$Y_{CMD}$	$Y_{EXP}$	$Y_{EXP}/Y_{CMD}$
Gluconsäure	1,09	1,03	95 %
Ethanol	0,51	0,45	88 %
Zitronensäure	1,07	0,8	75 %
PHB	0,48	0,33	68 %
Streptomycin	0,84	0,1	12 %

# Leistungsgrenzen abgeschätzt aus extremen *Pathways* ?

**Annahme:** Nachfolgende Enzyme wurden erkannt



Route	$\Sigma$	$Y_{L/A}$ (mol-L/mol-A)
[2(-g),3a,3b,2c,d,e,f,k,m]	$A \rightarrow L$	1
[3a,3b,2c,d,e,f,3k,5m,2h]	$3 A \rightarrow 5 L$	1.67
[g,h,k,2m]	$A \rightarrow 2 L$	2

Maximal mögliche Erträge abschätzbar

Welche Route, welcher Ertrag



???

# MFA – Metabolic Flux analysis

**Andere Begriffe:** **FBA** - Flux Balance Analysis, **MPA** - Metabolic Pathway Analysis

**Fluss-Definition:** “Reaktionsgeschwindigkeit” bezogen auf die Trockenmasse.

$$CO_2 - Fluss = \frac{CO_2 - produziert \left[ mol l^{-1} \right]}{t[s] \cdot Biomasse \left[ mol l^{-1} \right]}$$

**Massenbilanz:** (mathematische Grundlage der MFA)

Akkumulation = Reaktion + Transport

$$\frac{d M_n}{d t} = S_n v_n - b_n$$

$M_n$  – Metabolitvektor

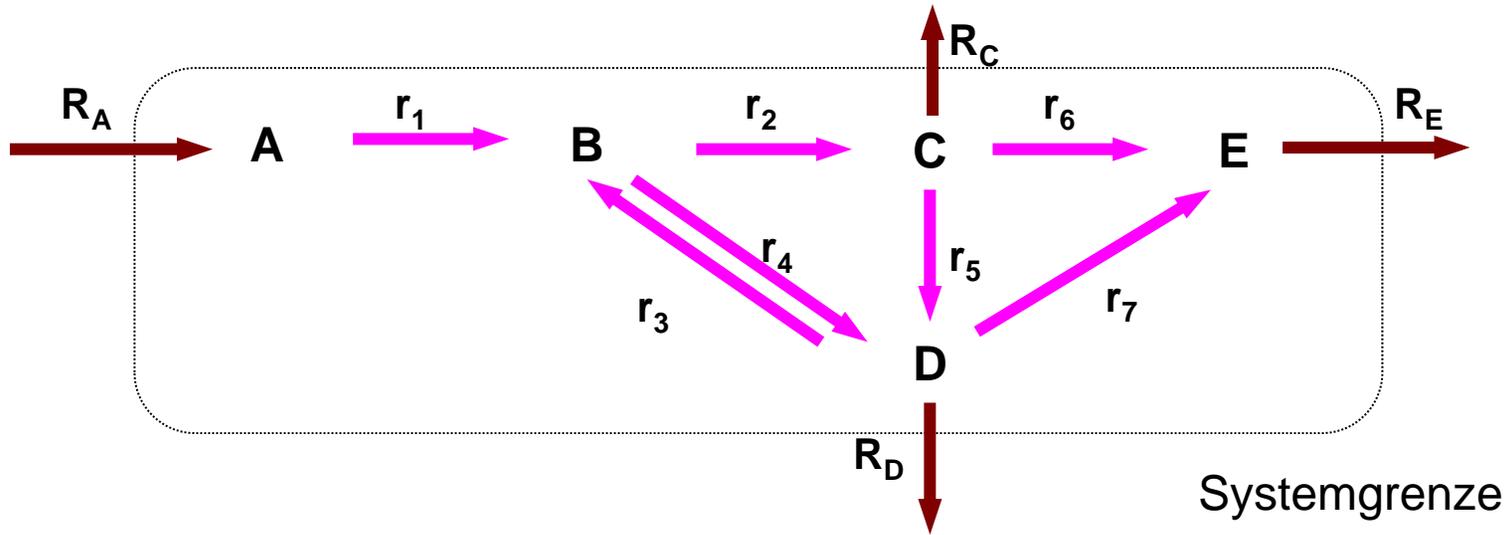
$S_n$  – Stöchiometrische Matrix

$b_n$  - Transportvektor

**Grundannahme:** *stationärer Zustand*

$$\frac{d M_n}{d t} = 0 = S_n v_n - b_n$$

Die Zeitkonstanten des Wachstums ist sehr viel größer als die assoziiert mit den Metabolitreaktionen



### Massenbilanz

$$\mathbf{A}: -r_1 = -R_A$$

$$\mathbf{B}: +r_1 - r_4 - r_2 + r_3 = 0$$

$$\mathbf{C}: r_2 - r_5 - r_6 = +R_C$$

$$\mathbf{D}: -r_3 + r_5 + r_4 - r_7 = +R_D$$

$$\mathbf{E}: +r_6 + r_7 = +R_E$$

$$\mathbf{S} \cdot \mathbf{v} = \mathbf{b}$$



$$\begin{matrix}
 \begin{bmatrix} r_1 & r_2 & r_3 & r_4 & r_5 & r_6 & r_7 \end{bmatrix} \\
 \begin{pmatrix} -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & -1 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & -1 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 1 & 1 & 0 & -1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 \end{pmatrix} \\
 \underbrace{\hspace{15em}}
 \end{matrix}
 =
 \begin{matrix}
 \begin{pmatrix} -R_A \\ 0 \\ R_C \\ R_D \\ R_E \end{pmatrix} \\
 \underbrace{\hspace{15em}}
 \end{matrix}$$

Interne Flüsse

Transport Fluss

Zahl der Freiheitsgrade=

Zahl der unbekanntenen Flüsse – Anzahl  
der Bestimmungsgleichungen- Anzahl der  
exp. Informationen

$> 0$

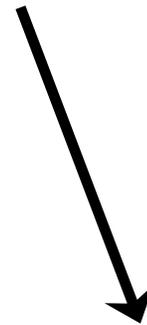
$= 0$

$< 0$

Mehrere Lösungen  
möglich; schließe  
weitere Experimente ein;  
oder Optimiere

Es existiert eine Lösung

System überbestimmt,  
statistische Absicherung



# Vorgehensweise

- I. Konstruktion der stöchiometrischen Matrix
- II. Einbau der experimentellen Parameters in das Modell
- III. Definieren der physiologisch sinnvollen Zielfunktion und der einschränkenden Bedingungen
- IV. Graphische Visualisierung und Analyse der Flüsse

# Genutzte Reaktionen (*E. coli*)

## Teil I

### Glycolysis

-1ATP+1ADP+2Pi-1G1P+1Glycogen;  
+1G1P-1G6P;  
-1ATP+1ADP-1Glc+1Pi+1G6P;  
+1F6P-1G6P;  
-1F6P+1G6P;  
+1NADH+1ATP-1ADP-1Pi-1T3P+1ThreePG;  
-1NADH-1ATP+1ADP+1Pi+1T3P-1ThreePG;  
+1PEP-1ThreePG;  
-1PEP+1ThreePG;  
+1ATP-1ADP-1Pi-1PEP+1Pyr;  
-2ATP+2ADP+2Pi+1PEP-1Pyr;  
+1CO-1ATP+1ADP+1Pi+1PEP-1OA;  
-1CO-1PEP+1OA;  
-1NADH-1Pyr+1Lactate;  
+1NADH+1Pyr-1Lactate;  
-1Pyr+1AcCoA+1Formate;  
+1Pyr-1AcCoA-1Formate;  
+1ATP-1ADP-1Pi-1AcCoA+1Acetate;  
-1ATP+1ADP+1Pi+1AcCoA-1Acetate;  
-2ATP+2ADP+2Pi+1AcCoA-1Acetate;  
-2NADH-1AcCoA+1Ethol;  
-1ATP+1ADP-1GL+1GL3P;  
+1NADH+1T3P-1GL3P;  
-1NADPH-1T3P+1GL3P;

### Pentose Pathway

+2NADPH+1CO+1R5P-1G6P;  
-1ATP+1ADP+1Pi+2T3P-1F6P;  
+1Pi-2T3P+1F6P;  
+1E4P-2R5P+1F6P;  
-1E4P+2R5P-1F6P;  
-1E4P+1T3P-1R5P+1F6P;  
+1E4P-1T3P+1R5P-1F6P;  
-1T3P+2R5P-1S7P;  
+1T3P-2R5P+1S7P;  
-1E4P+1T3P-1F6P+1S7P;  
+1E4P-1T3P+1F6P-1S7P;

### Citric Acid Cycle

+1CO+1NADH-1Pyr+1AcCoA;  
-1OA-1AcCoA+1Citrate;  
-1Citrate+1ICitrate;  
+1Citrate-1ICitrate;  
+1NADPH+1CO+1aKG-1ICitrate;  
-1NADPH-1CO-1aKG+1ICitrate;  
+1CO+1NADH-1aKG+1SuccCoA;  
+1ATP-1ADP-1Pi-1SuccCoA+1Succ;  
-1ATP+1ADP+1Pi+1SuccCoA-1Succ;  
+1FADH-1Succ+1Fum;  
-1Fum+1Malate;  
+1Fum-1Malate;  
+1NADH+1OA-1Malate;  
+1NADPH+1CO+1Pyr-1Malate;  
+1CO+1NADH+1Pyr-1Malate;

### Gloaxalate Shunt

-1AcCoA-1Glx+1Malate;  
+1Succ+1Glx-1ICitrate;

### Transfer of 1 Carbon Compounds

-1DHF-1NADPH;  
-1GLY+1NH+1MethyleneTHF+1CO;  
-1MethyleneTHF-1FADH+1MethylTHF;  
-1MethyleneTHF+1MethenylHF+1NADH;  
-1MethenylHF+1FormylTHF;

# Genutzte Reaktionen (*E. coli*)

## Teil II

### Trans-hydrogenation reactions

-1NADPH+1NADH;  
+1NADPH-1NADH-2Hexp;  
-1NADH+1QH;  
-1NADH+2Hexp+1QH;  
-1FADH+1QH;  
+2Hexp-1QH-0.5Oxygen;  
-1ATP+1ADP+1Pi+3Hexp;  
+1ATP-1ADP-1Pi-3Hexp;

### Lipid Synthesis

-1CO-1ATP+1ADP+1Pi-1AcCoA+1MalACP;  
-12NADPH-1AcCoA-6MalACP+1C4C;  
-11NADPH-1AcCoA-6MalACP+1C4iC;  
-14NADPH-1AcCoA-7MalACP+1C6C;  
-13NADPH-1AcCoA-7MalACP+1C6iC;  
-15NADPH-1AcCoA-8MalACP+1C8IC;  
-1GL3P-1C6C-1C6iC+1PA;  
+1PPi-1CTP-1PA+1CDPDG;  
-1SER+1CMP-1CDPDG+1PS;  
+1CO-1PS+1PE;  
+1Pi+1CMP-1GL3P-1CDPDG+1PG;  
+1GL-2PG+1CL;

### Amino Acid Synthesis

-1CO-1GLN-2ATP+1GLU+1CAP+2ADP+1Pi;  
-1NADPH-1ATP+1ADP+4Pi-1E4P-2PEP+1Chor;  
+1CO-1GLU-1Chor+1aKG+1PHE;  
+1CO+1NADH-1GLU-1Chor+1aKG+1TYR;  
+1CO-1GLN+1GLU-1Chor-1PRPP+1IGP+1Pyr+1PPi;  
-1IGP-1SER+1T3P+1TRP;  
-1GLU+1aKG-1OA+1ASP;  
-1GLN-1ATP+1GLU+1ADP+1Pi-1ASP+1ASN;  
-1NADPH-1ATP+1ADP+1Pi-1ASP+1ASPSA;  
-1NADPH-1GLU+1aKG-1Pyr-1ASPSA-  
1SuccCoA+1Succ+1mDAP;  
+1CO-1mDAP+1LYS;  
-1NADPH-1ASPSA+1HSer;  
+1NH-1MethylTHF+1Pyr-1SuccCoA+1Succ-1HSer-  
1CYS+1MET;  
-1ATP+1ADP+2Pi-1HSer+1THR;  
-1NADPH+1NH+1CO-1GLU+1aKG-1Pyr-1THR+1ILE;  
-1NADPH-1NH+1GLU-1aKG;  
-1NH+1GLN-1ATP-1GLU+1ADP+1Pi;  
-1NADPH-1GLN+2GLU-1aKG;  
-2NADPH-1NADH-1ATP-1GLU+1ADP+1Pi+1PRO;  
-1NADPH-1ATP-2GLU+1ADP+1Pi+1aKG-  
1AcCoA+1Acetate+1Om;  
-1CAP+1Pi-1Om+1Citri;  
-1ATP+1PPi-1ASP-1Citri+1Fum+1ARG+1AMP;  
-1GLU+1aKG+1SER-1ThreePG;  
+1GLY+1MethyleneTHF-1SER;  
-1SER+1CYS-1AcCoA+1Acetate-1H2S;  
-1GLU+1aKG-1Pyr+1ALA;  
-1NADPH+1CO-2Pyr+1Kval;  
-1GLU+1aKG-1Kval+1VAL;  
+1CO+1NADH-1GLU+1aKG-1AcCoA-1Kval+1LEU;  
-1ATP+1PRPP+1AMP-1R5P;  
+2NADH-1GLN-1ATP+1Pi+1aKG-1PRPP+2PPi+1HIS+1PRAIC;  
-1GLY-1CO-1MethenylHF-2GLN-4ATP+2GLU+4ADP+4Pi-  
1PRPP+1PPi-1ASP+1Fum+1PRAIC;

# Genutzte Reaktionen (*E. coli*)

## Teil III

### Nucleotide Biosynthesis

-1FormylTHF-1PRAIC+1IMP;  
+1Pi-1ASP+1Fum+1AMP-1IMP-1GTP+1GDP;  
+1NADH-1GLN-1ATP+1GLU+1PPi+1AMP-1IMP+1GMP;  
+1CO+1FADH-1CAP+1Pi-1PRPP+1PPi-1ASP+1UMP;  
-1GLN-1ATP+1GLU+1ADP+1Pi-1UTP+1CTP;  
-1ATP+2ADP-1AMP;  
-1ATP+1ADP+1GDP-1GMP;  
-1ATP+1ADP-1UMP+1UDP;  
-1ATP+1ADP-1CMP+1CDP;  
-1ATP+1ADP+1GTP-1GDP;  
+1ATP-1ADP-1GTP+1GDP;  
-1ATP+1ADP+1UTP-1UDP;  
-1ATP+1ADP+1CTP-1CDP;  
+1Pi-1CTP+1CDP;  
-1ADP-1TREDH+1dADP;  
-1GDP-1TREDH+1dGDP;  
-1CDP-1TREDH+1dCDP;  
-1UDP-1TREDH+1dUDP;  
-1ATP+1ADP-1dADP+1dATP;  
-1ATP+1ADP-1dGDP+1dGTP;  
-1ATP+1ADP-1dCDP+1dCTP;  
-1ATP+1ADP-1dUDP+1dUTP;  
+1DHF-1MethyleneTHF-2ATP+2ADP+1PPi-1dUTP+1dTTP;  
+1NH-1dCTP+1dUTP;  
-1NADPH+1TREDH;

### Cell Wall Synthesis

-1GLN+1GLU+1PPi-1AcCoA-1UTP-1F6P+1UDPNAG;  
+2Pi-1PEP+1PPi-1R5P-1CTP+1CMPKDO;  
-1ATP+6ADP+2Pi+1PPi+2Acetate+1UMP+1UDP+3CMP+3CDP-2C4C-4C4iC-2UDPNAG-3CMPKDO-3CDPEtN-2ADPGlc-3ADPHexp+1LPS;  
+1CO-1ATP+1ADP+1PPi-1SER-1CTP+1CDPEtN;  
-1ATP+1PPi+1ADPGlc-1G1P;  
-1ATP+1PPi+1ADPHexp-1S7P;  
-1NADPH-5ATP-1GLU+5ADP+7Pi-1PEP-1mDAP-2ALA+1UMP+1UDP-2UDPNAG+1Pept;  
+1CO-1Om+1PTRSC;  
+1MethyleneTHF+1CO-2ATP+1ADP+1Pi+1PPi-1MET+1AMP+1H2S-1PTRSC+1SPRMD;

### Sulphur

-4NADPH-2ATP+1ADP+1Pi+1PPi+1AMP+1H2S;

### Phosphate

+2Pi-1PPi;

### Transport

+1Pi;

+1Oxygen;

+1NH;

-1CO;

-1BIOM;

+1Glc;

+1Acetate;

# Wachstumsgleichung

Resultiert aus den Metabolitanforderungen für eine gegebene Biomassezusammensetzung von *E.coli*.

+1BIOM-0.582GLY-0.0485MethylTHF-0.25GLN-**45.135ATP+44.96ADP+ 44.96Pi**-  
0.25GLU-0.176PHE-0.131TYR-0.205SER-0.054TRP-0.229ASP-0.229ASN-0.326LYS-  
0.087CYS-0.146MET-0.241THR-0.276ILE-0.21PRO-0.281ARG-0.488ALA-0.402VAL-  
0.428LEU-0.09HIS-0.203GTP-0.136UTP-0.126CTP-0.0247dATP-0.0254dGTP-  
0.0254dCTP-0.0247dTTP-0.00258PS -0.09675PE-0.02322PG-0.00645CL-  
0.00785LPS-0.0276Pept-0.0341PTRSC-0.007SPRMD-0.154Glycogen;

Millimoles Metabolit in 1 g trockene Biomasse



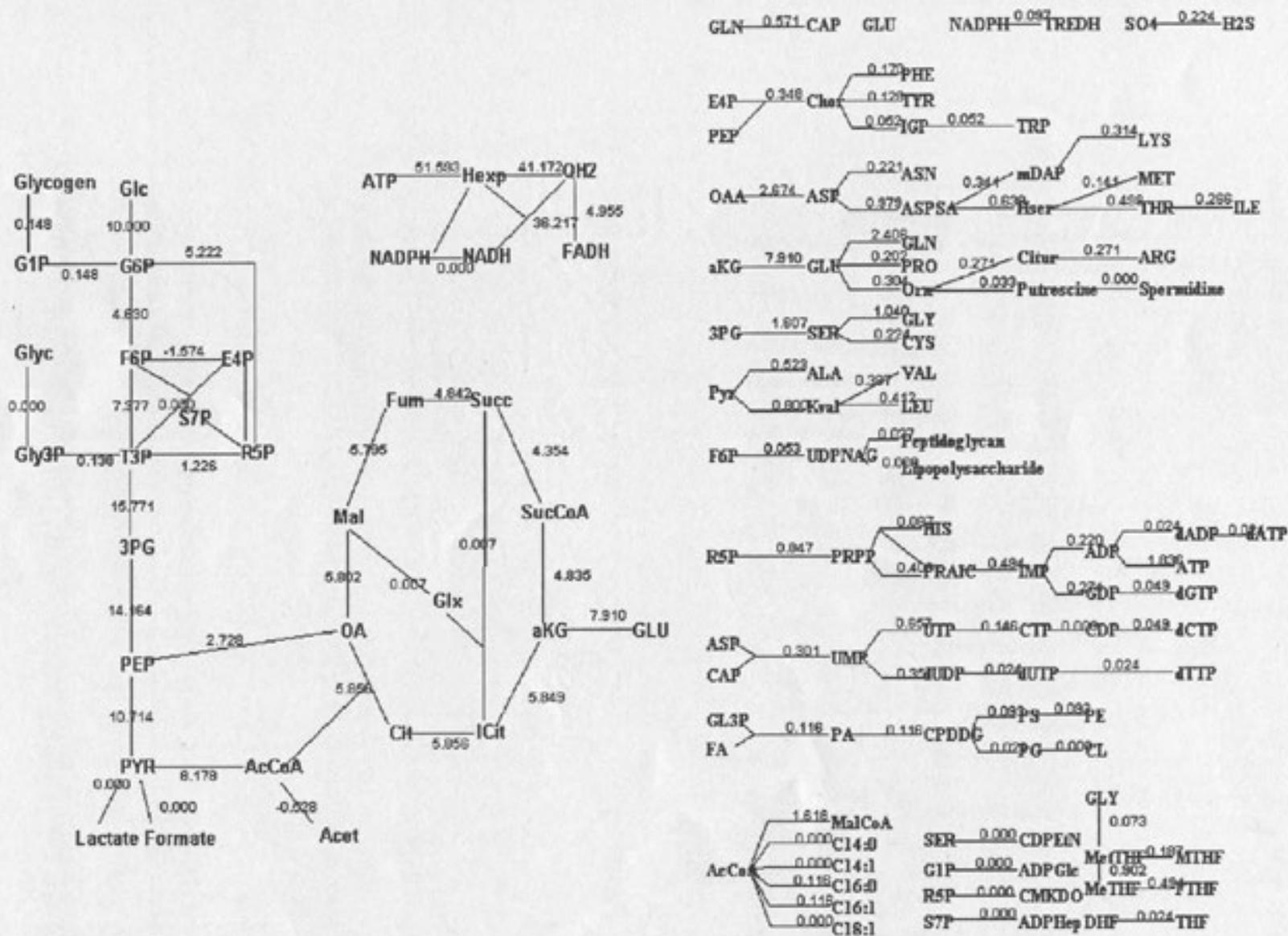
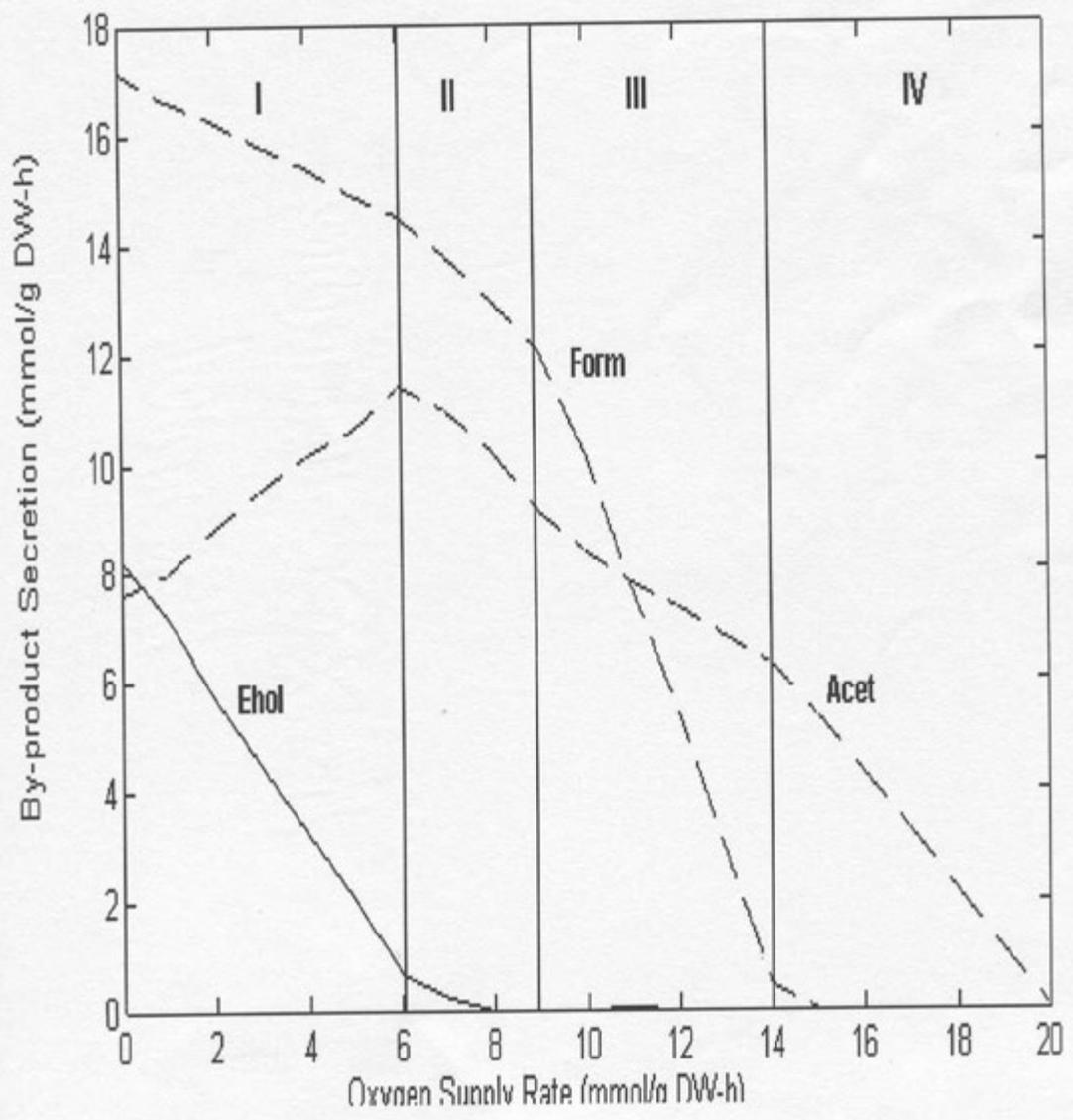
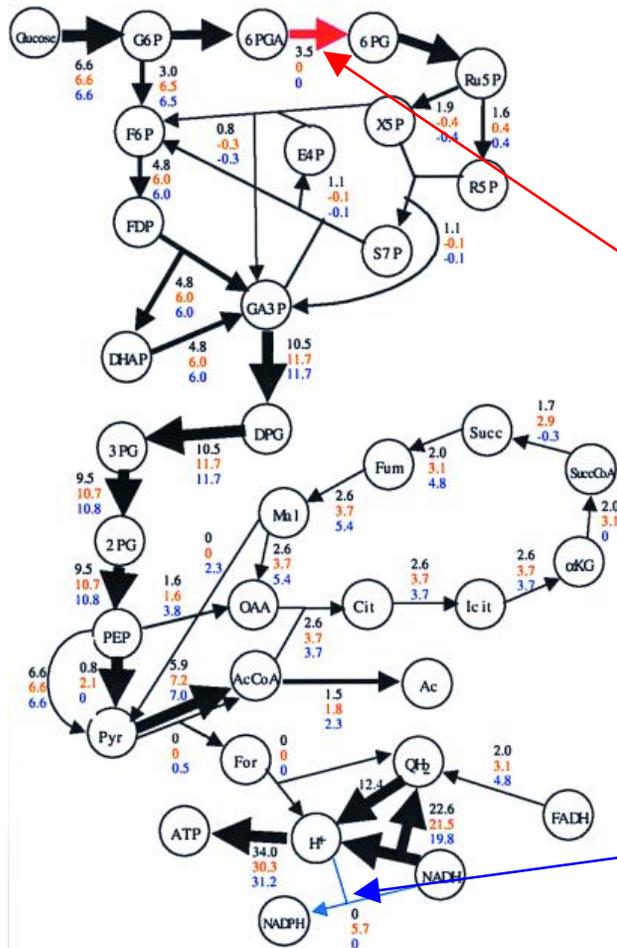


Figure 2. Optimal Flux distribution with 10 mmol/g DW-h Glucose

Optimal By-product Secretion for Various Oxygenation Rate



# Edwards & Palsson (2000)

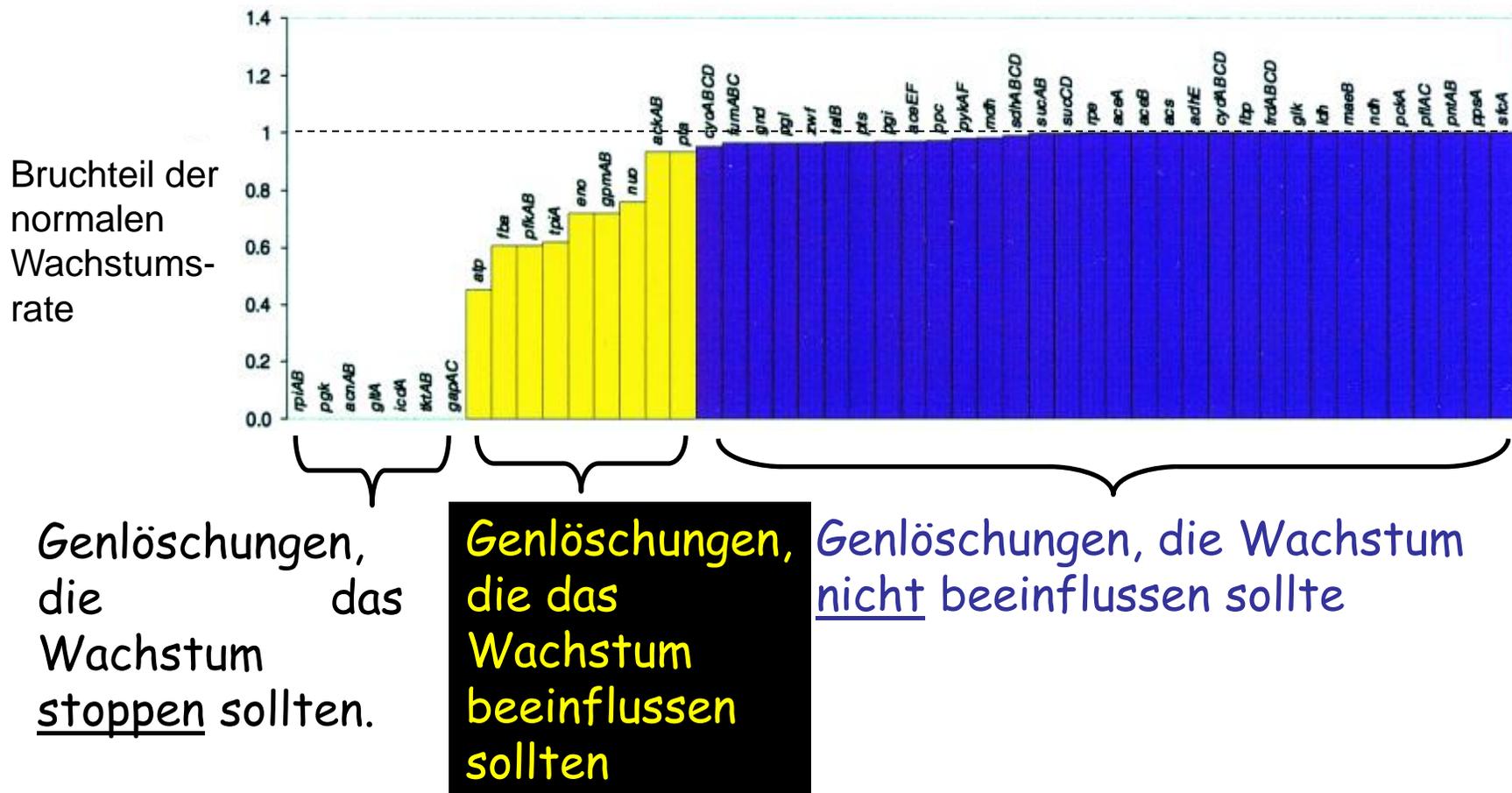


Reference: *PNAS* **97**: 5528-33, 2000.

*Metabolic Flux Analysis* wird angewandt um die Konsequenzen der Löschung von Enzymen für *E. coli* vorherzusagen.

Konsequenzen der **Löschung** von Enzymen.

# Edwards & Palsson (2000)



# Edwards & Palsson (2000)

Vergleich der Vorhersagen zum Verhalten der *E. coli* Mutanten mit dem Experiment zeigt:

In 68 von 79 Fällen (86%) stimmt die Vorhersage !!!

# Anwendungen

- Quantifizierung der verschiedenen intrazellulären Flüsse
- Identifizierung metabolischer Flaschenhälse
- Berechnung nicht-messbarer extrazellulärer Flüsse
- Einfluss alternativer Routen auf die Flussverteilung
- Berechnung des maximal möglichen Ertrages
- Hinweise zur phenotypischen Optimierung
- Hinweise zur genotypischen Optimierung

# MFA und Gentechnik -> Optimierung von Biokatalysatoren

- 1. Entwicklungsstufe: Optimierung lebender Zellen
- 2. Entwicklungsstufe: künstliche Minimalzellen

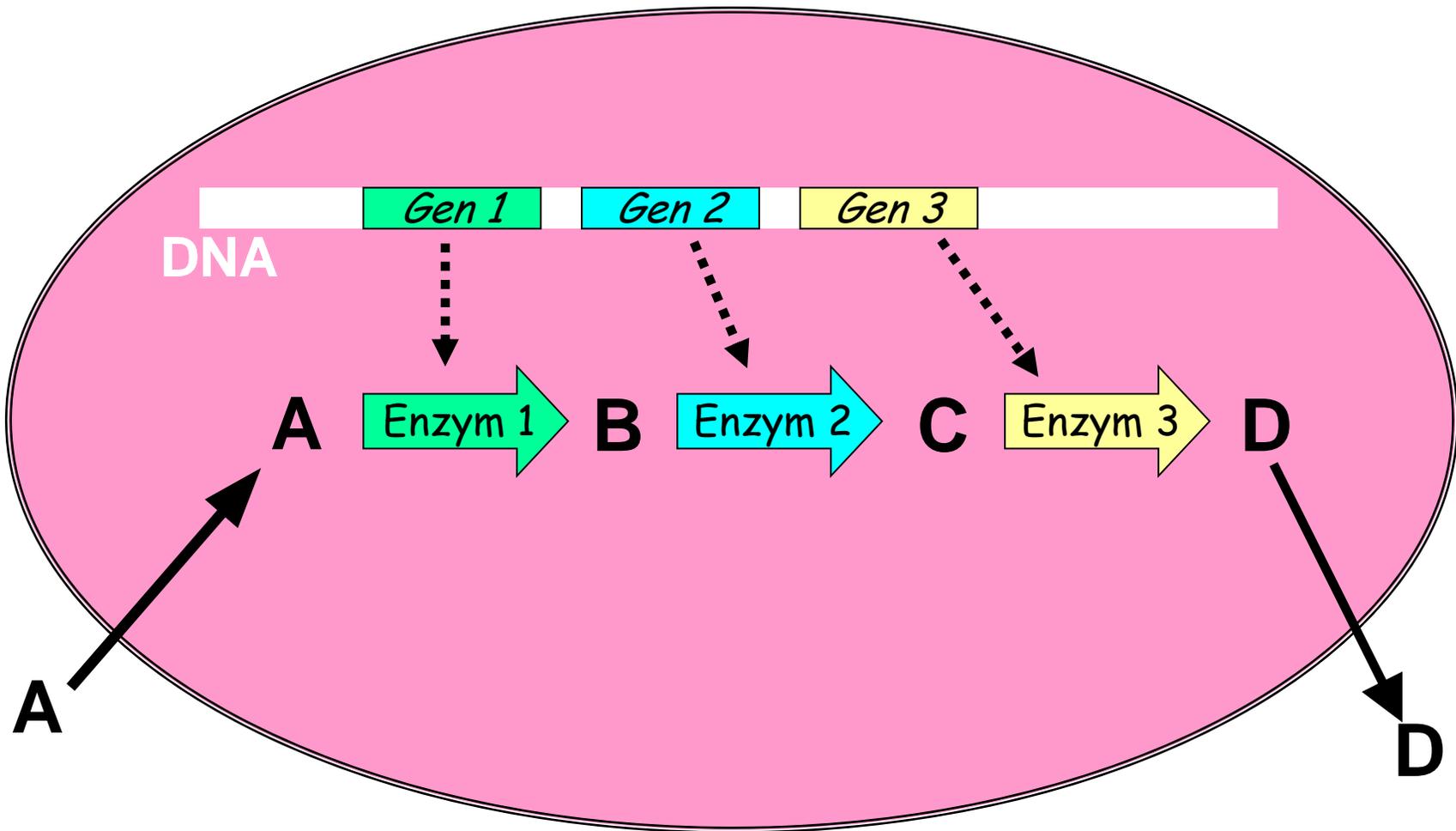
# Grenzen von Wildtypbakterien



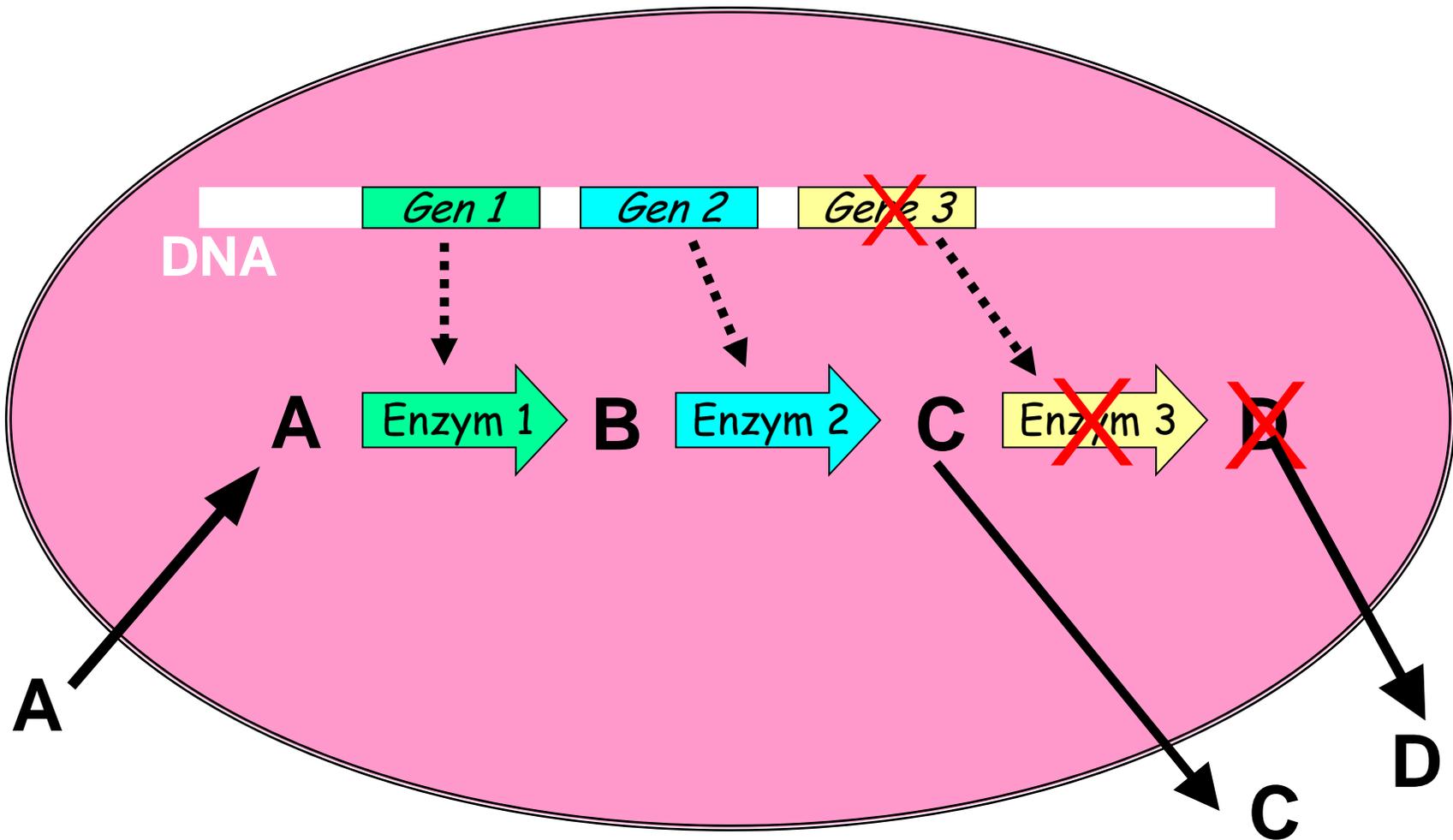
coolgov.com

Bakterien müssen sich in Wettbewerbssituationen in einer natürlichen Umwelt durchsetzen. Wertstoffproduktionen gibt es deshalb nur in Ausnahmesituationen.

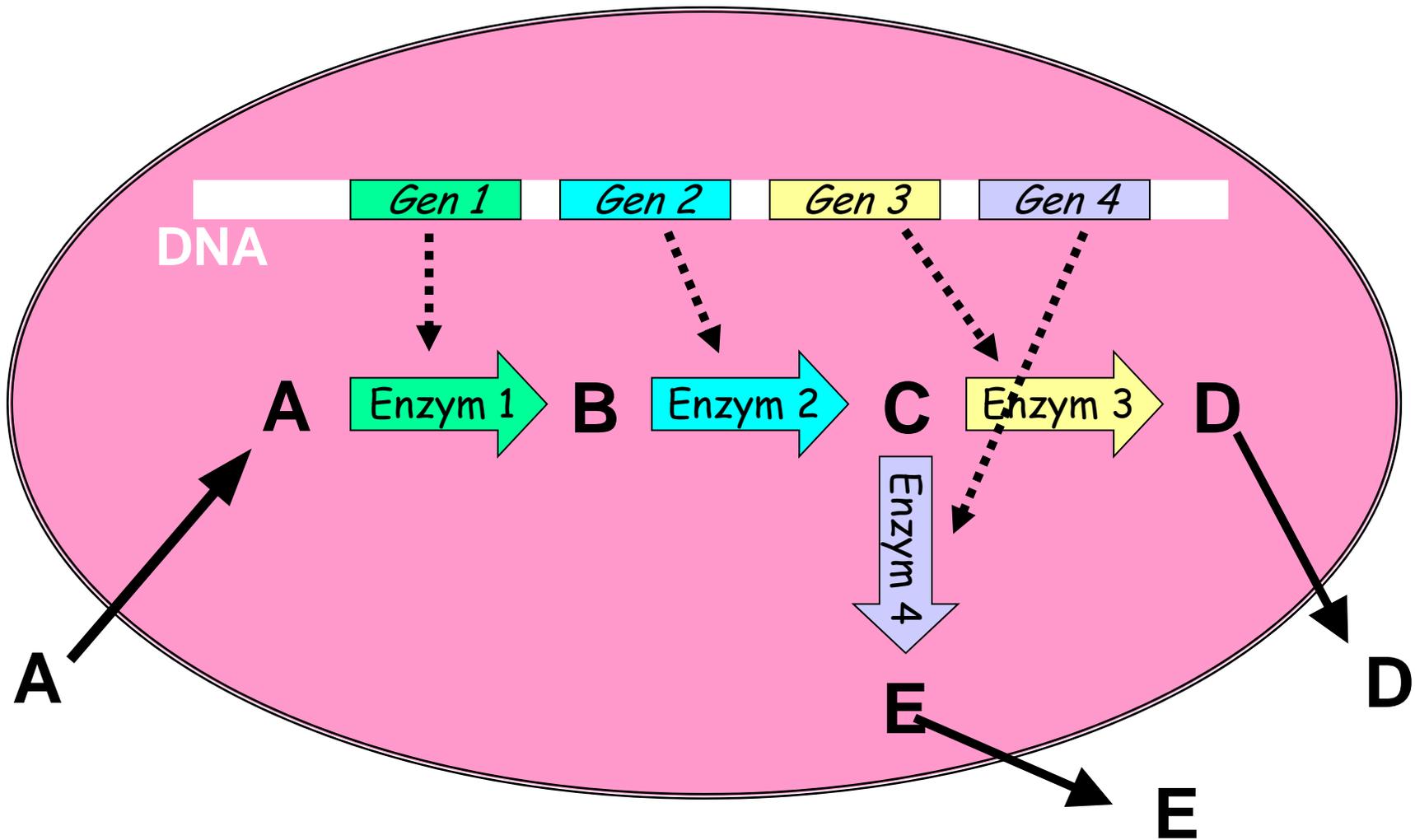
# Massgeschneiderte Zelle durch *Genetic Engineering*



# Löschen eines Gens



# Hinzufügen eines neuen Gens



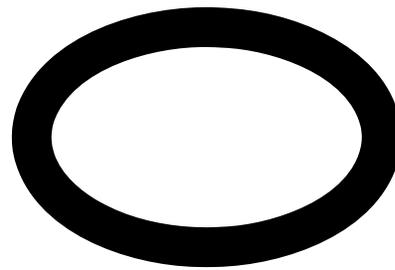
# Wie werden genetische Veränderungen durchgeführt?

Der häufigste Weg:

1. Bau das interessierende Gen in einen Vektor, einen DNA-Ring (Plasmid).
2. Transportiere das Plasmid in die Wirtszelle.



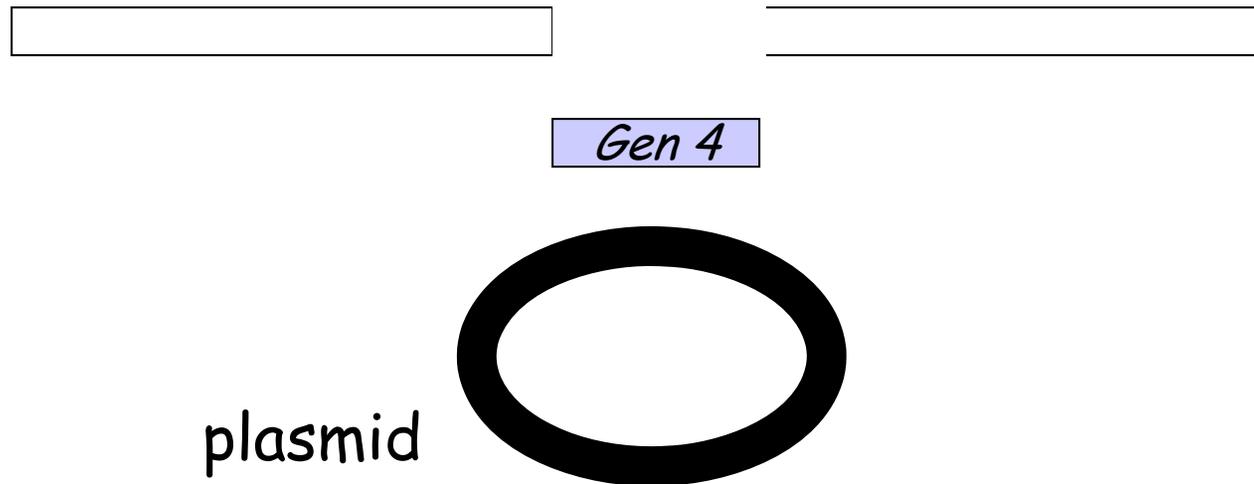
Plasmid



# Wie werden genetische Veränderungen durchgeführt?

Der häufigste Weg:

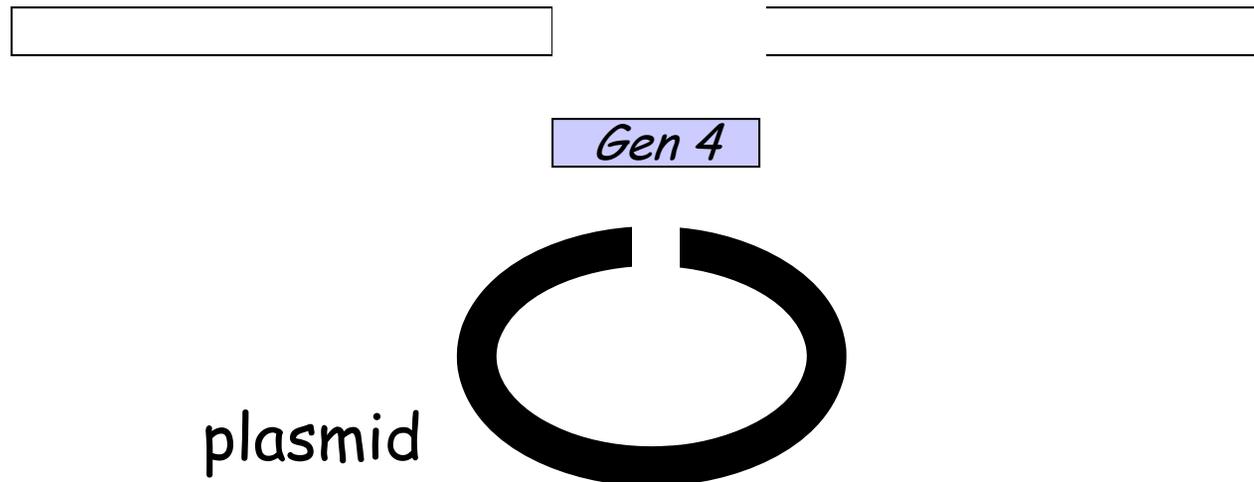
1. Bau das interessierende Gen in einen Vektor, einen DNA-Ring (Plasmid).
2. Transportiere das Plasmid in die Wirtszelle.



# Wie werden genetische Veränderungen durchgeführt?

Der häufigste Weg:

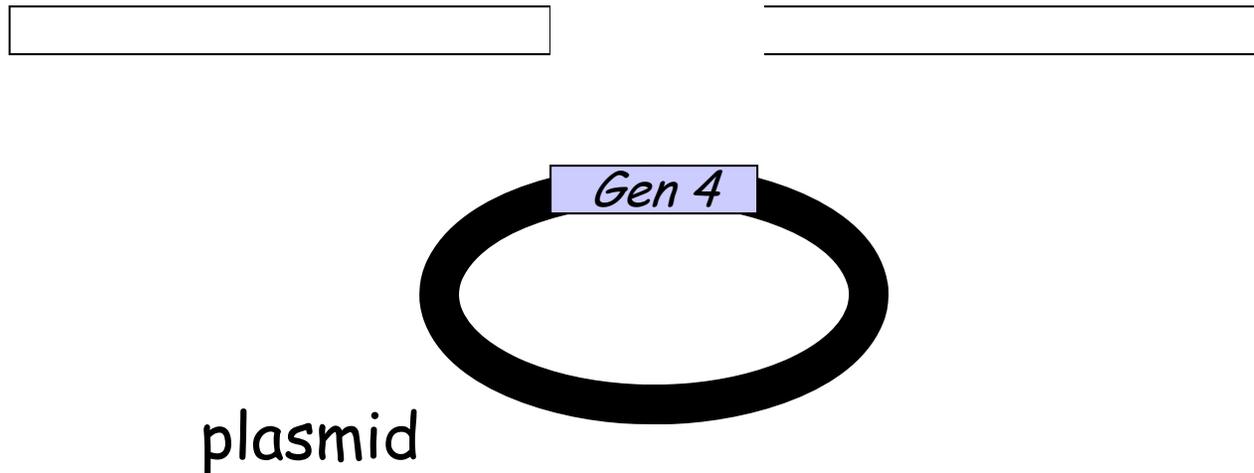
1. Bau das interessierende Gen in einen Vektor, einen DNA-Ring (Plasmid).
2. Transportiere das Plasmid in die Wirtszelle.



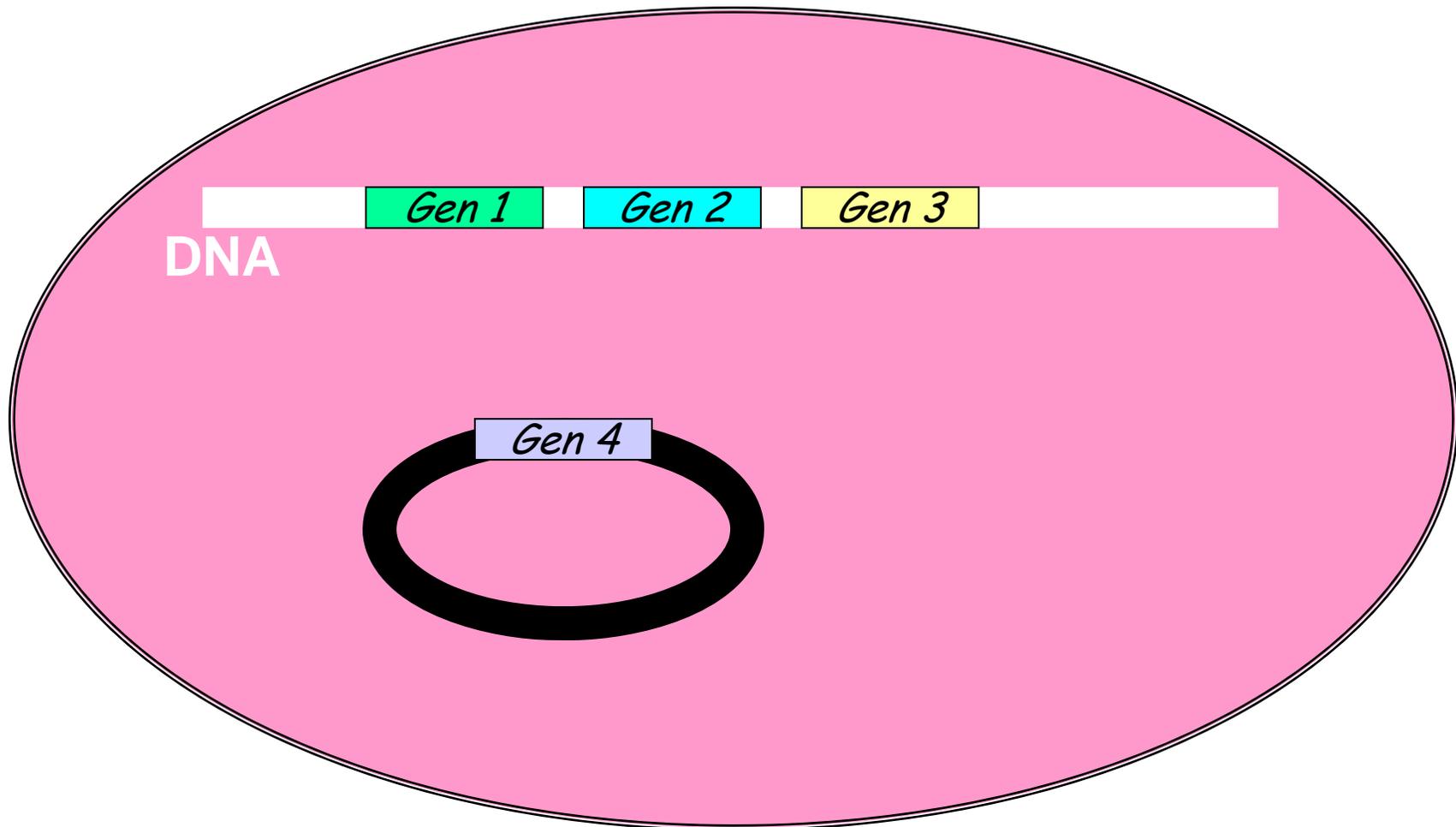
# Wie werden genetische Veränderungen durchgeführt?

Der häufigste Weg:

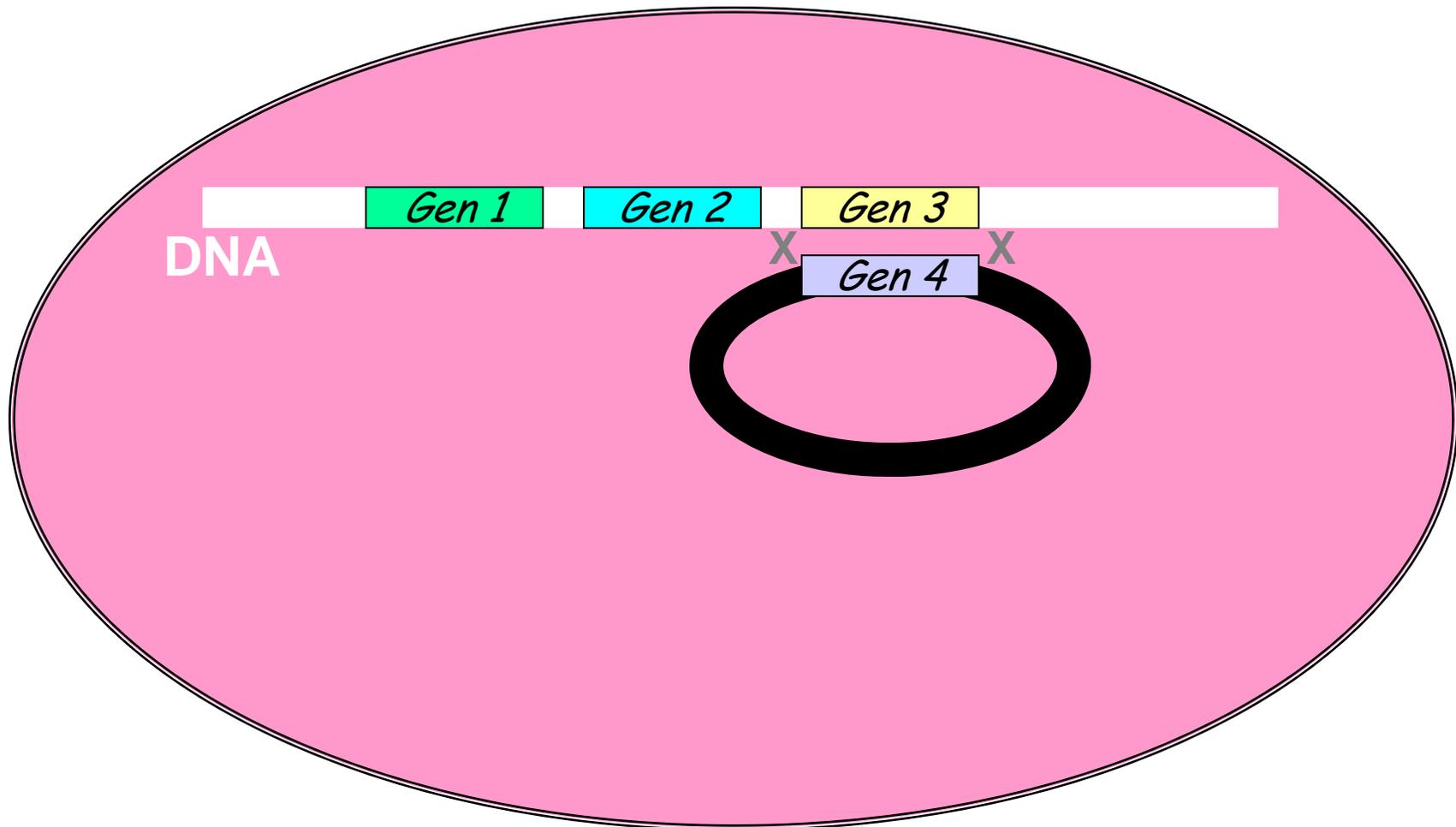
1. Bau das interessierende Gen in einen Vektor, einen DNA-Ring (Plasmid).
2. Transportiere das Plasmid in die Wirtszelle.



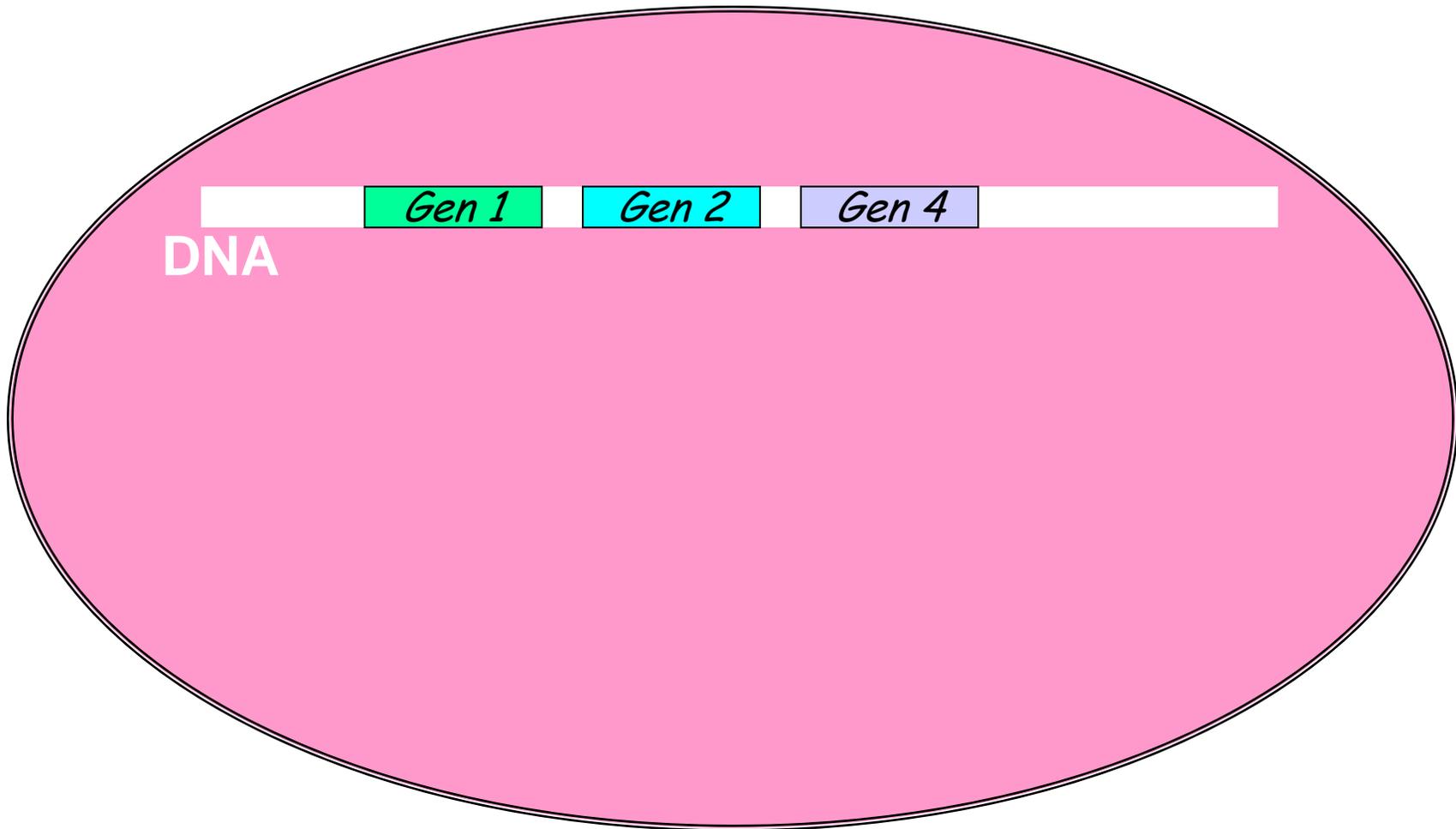
# Wie werden genetische Veränderungen durchgeführt?



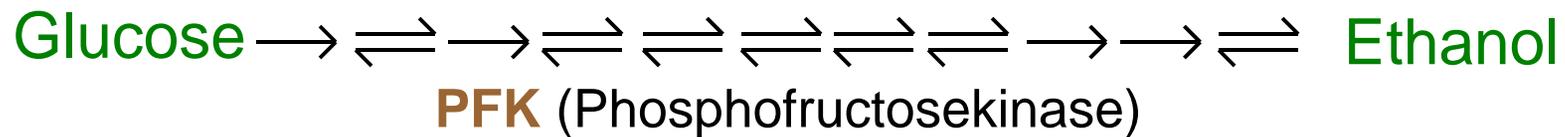
# Wie werden genetische Veränderungen durchgeführt?



# Wie werden genetische Veränderungen durchgeführt?



# Missgeschick von *Metabolic Engineering*: Maximierung der Ethanol Produktion



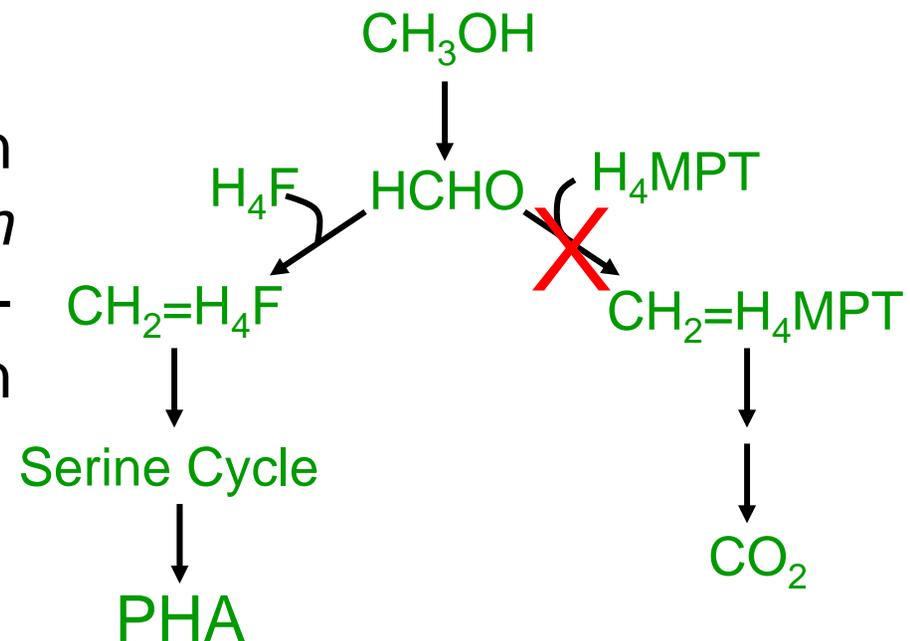
**PFK** wurde als geschwindigkeitsbestimmendes Enzym der alkoholischen Gärung angenommen. Also wurde seine Konzentration genetisch gesteigert.

Problem: Die Geschwindigkeit der alkoholischen Gärung stieg nicht an !!!

# Missgeschick von *Metabolic Engineering*: Maximierung der PHA Produktion

## Idee:

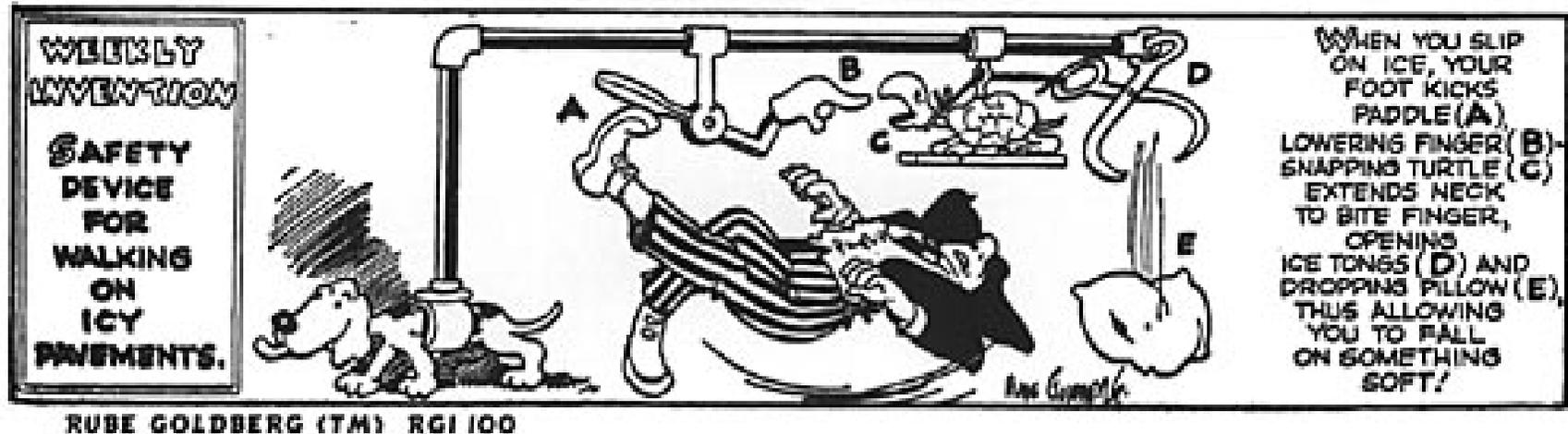
Maximiere PHA Produktion in *M. extorquens* durch *knock out* des Start-enzymes der rechten metabolischen Route.



## Probleme:

- $\text{HCHO}$  (Formaldehyd) akkumuliert und vergiftet die Zelle
- Die Zelle hat nicht genügend Energie für das Wachstum

# Problem: Menschen denken linear...

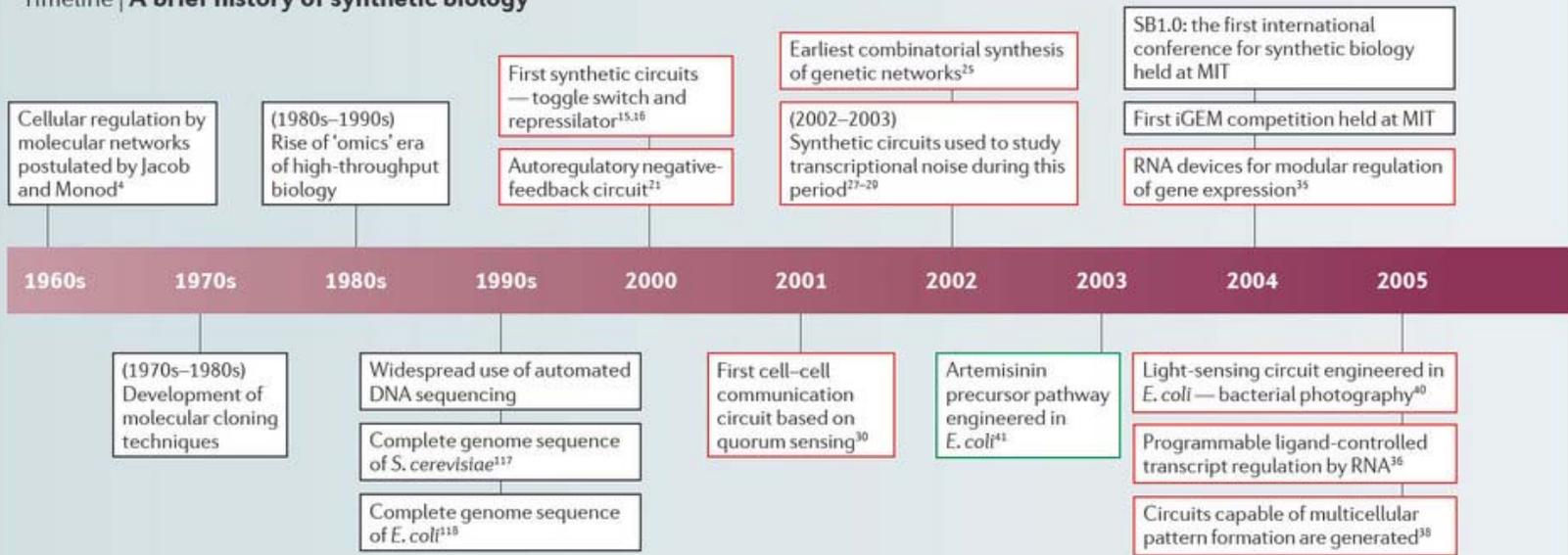


...aber biologische Systeme enthalten:

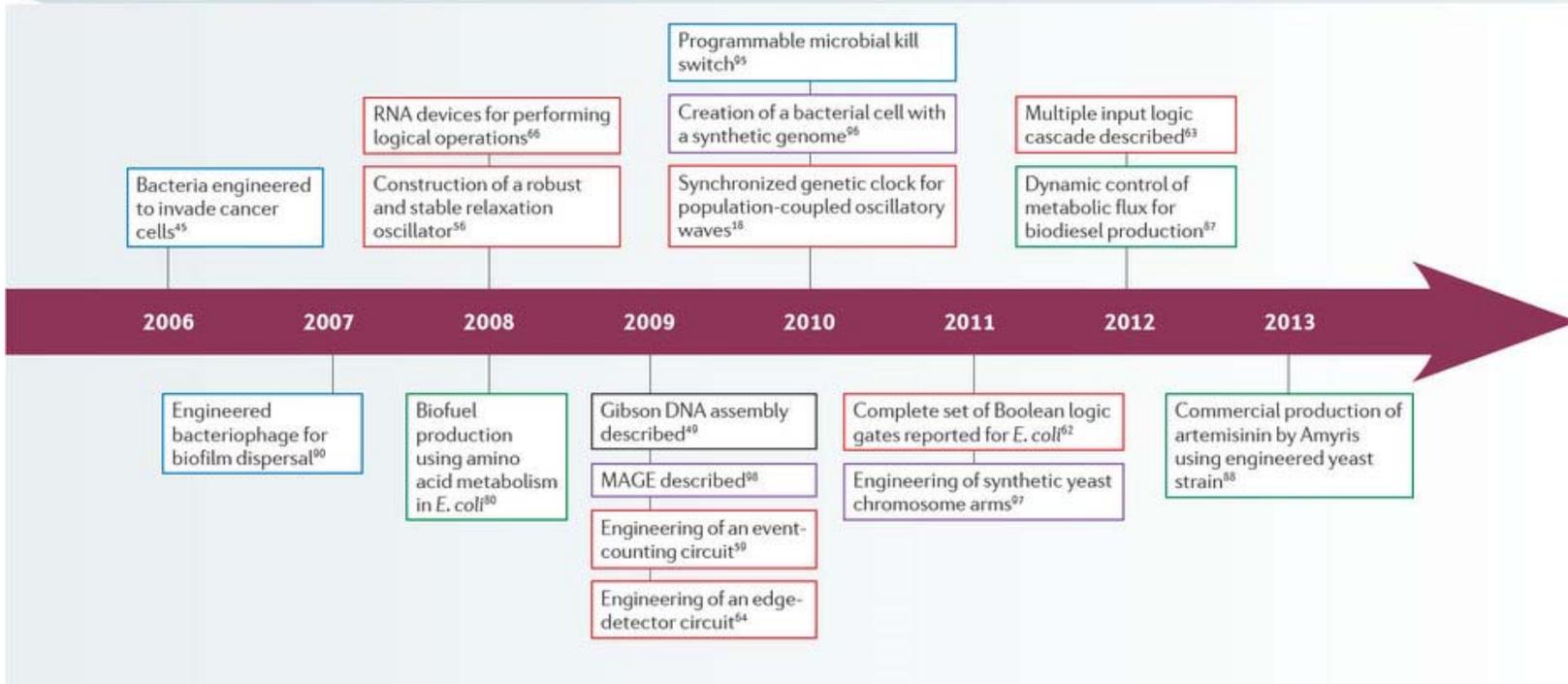
- nicht-lineare Interaktionen zwischen den Komponenten
- positive und negative *feedback* Schleifen
- komplexe *cross-talk* Phänomene

-> nächste Vorlesung: **MCA** – Metabolic Control Analysis

Timeline | **A brief history of synthetic biology**



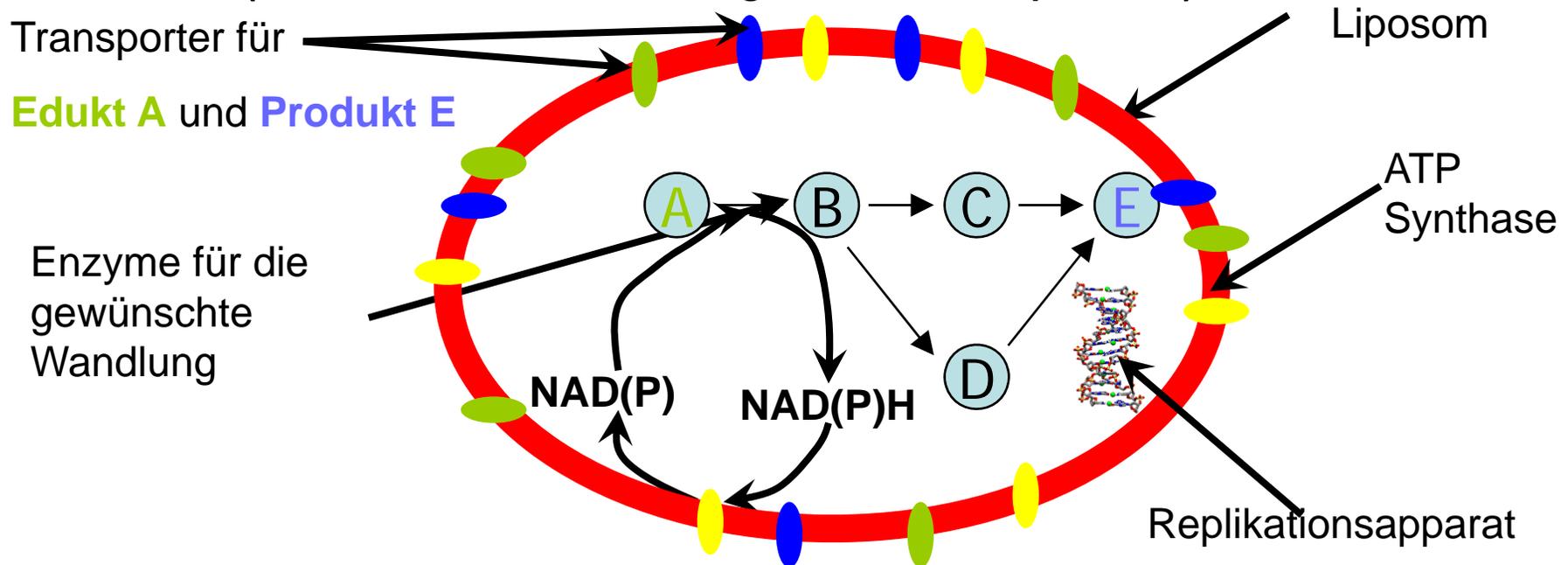
Key to coloured boxes: technical or cultural milestones (black); circuit engineering (red); synthetic biology in metabolic engineering (green); therapeutic applications (blue); whole genome engineering (purple). *E. coli*, *Escherichia coli*; iGEM, International Genetically Engineered Machine; MAGE, multiplex automated genome engineering; MIT, Massachusetts Institute of Technology; SB1.0, Synthetic Biology 1.0; *S. cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae*.



# MFA und Gentechnik -> Optimierung von Biokatalysatoren

## 2. Entwicklungsstufe: künstliche Minimalzellen

(nur auf den Verwendungszweck hin optimiert)



Craig Venters "Minimal Genome"-Projekt (2002), gerade genug Gene für grundlegenden Stoffwechsel + Replikation. Ausgangspunkt *Mycoplasma genitalium* nur 470 Gene. 2010 Herstellung eines künstlichen Bakteriums.

Ein anderer Ansatz Pier Luigi Luisi (ETH): Kombination vorhandener biologischer Makromoleküle zu einer lebenden Entität.

## **Kleines Pepetitorium:**

- Welche Arten von Modellen gibt es? Was sind Vorzüge und Nachteile der jeweiligen Modelle ?
- Berechne den maximalen Ertragskoeffizienten (g-Biomasse/g-Substrat) für das Wachstum auf Glucose mit Hilfe des  $Y_{ATP}$  – Konzepts.
- Was ist MFA? Was sind die mathematischen Grundlagen? Für welche Art Aussagen ist die MFA nicht geeignet?

# Empfehlungen für weiteres Lesen

## Zur Vertiefung der Vorlesung:

Kholodenko BN, Westerhoff HV (2004) Metabolic engineering in the post genomic era. Horizon Bioscience ISBN: 0-955232-2-9

Stephanopoulos GN, Aristidu AA, Nielsen J (1998) Metabolic engineering. Academic Press ISBN 0-12-666260-6

Voit EO (2000) Computational analysis of biochemical systems: A practical guide for biochemists and molecular biologists. Cambridge University Press ISBN 0-521-78087-0

U. Sauer, M. Heinemann, N. Zamboni (2007) Getting Closer to the Whole Picture. Science 316: 550-551

M. L. Shuler & F. Kargi (2002), Bioprocess Engineering: Basic Concepts, 2nd edition, Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ

An underwater scene with a blue color palette. In the center, the word "Fragen ?" is written in a bold, black, sans-serif font. The background shows a diver in the upper left, a vertical structure in the center, and various coral-like structures on the right and bottom. The lighting is dim, with a bright light source at the top right.

**Fragen ?**